



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

ESTUDO DE MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE
CÁLCIO, FERRO E VITAMINA C EM PRÉ-MISTURAS ENRIQUECIDAS EM MICRONUTRIENTES

por

Catarina Pereira de Melo Vila Real

junho, 2014



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

ESTUDO DE MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE
CÁLCIO, FERRO E VITAMINA C EM PRÉ-MISTURAS ENRIQUECIDAS EM MICRONUTRIENTES

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da
Universidade Católica Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

por
Catarina Pereira de Melo Vila Real

Local: Nestlé

Orientação: Engenheiro José Nelson Silva
Mestre Hugo Costa

Tutoria ESB: Doutora Ana Gomes

junho, 2014

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, que desde sempre me deram forças para continuar a trabalhar, mostrando-me que com esforço, dedicação, entrega e equilíbrio por vezes o que impossível parece, facilmente exequível se transforma. Sem a sua constante preocupação, o seu apoio genuíno, a disponibilidade incondicional e os ensinamentos de sempre garanto que ultrapassar esta meta não teria sido possível.

Muito obrigada por acreditarem em mim, por me tornarem, a cada dia, mais forte, confiante e lutadora e por me darem tudo de vocês sem esperar nada em troca. Obrigada por esse amor desinteressado!

Resumo

A elevada qualidade dos produtos alimentares tem-se tornado uma exigência cada vez mais presente nos mercados mundiais. Com o objetivo de colmatar as necessidades de latentes e crianças jovens é comum o recurso à fortificação em vitaminas e minerais na alimentação infantil sendo, assim, premente a garantia da qualidade destes produtos. Este controlo de qualidade pode ser feito em plena linha de produção, por metodologias de análise alternativas a metodologias de análise de referência, possibilitando o controlo permanente dos parâmetros essenciais de produção, permitindo a diminuição do tempo de liberação do produto e, ainda, a diminuição da quantidade de produto a retrabalhar.

O objetivo geral deste trabalho foi estudar a Espectroscopia de Fluorescência por Raios – X e a Espectroscopia de Infravermelho Próximo com Transformada de *Fourier*, métodos de análise alternativos à Espectrometria por Absorção Atômica na quantificação do teor de cálcio e do ferro e à Titulação Potenciométrica na quantificação do teor em vitamina C, em nove pré-misturas constituintes de produtos de nutrição infantil.

Para o desenvolvimento de modelos matemáticos robustos utilizaram-se amostras provenientes da linha de produção e amostras experimentais preparadas em laboratório, abrangendo uma larga gama de concentrações. O número de amostras utilizado para a construção de cada curva de calibração foi aproximadamente de trinta e três.

Foram desenvolvidos vinte e dois modelos de calibração, não sendo possível o desenvolvimento destes modelos para cinco pré-misturas, em três casos para ferro e em dois para cálcio, uma vez que não foram verificadas todas as condições de aplicabilidade da regressão linear. O coeficiente de correlação foi, em aproximadamente 86% dos casos, maior que 0,90, mostrando que a previsão dos resultados dados pelos métodos alternativos de análise se aproxima muito dos resultados medidos pelos métodos analíticos de referência.

Assim, é possível concluir-se que os dois métodos estudados são capazes de quantificar os teores de cálcio, ferro e vitamina C, em produtos de nutrição infantil, demonstrando uma correlação elevada com os métodos analíticos de referência. Para se perceber se de facto estes métodos analíticos podem ser usados como alternativa aos métodos analíticos de referência, deve-se efetuar a validação dos modelos atuais.

Palavras-Chave: Controlo de Qualidade; Espectroscopia de Fluorescência por Raios – X; Espectroscopia de Infravermelho Próximo com Transformada de *Fourier*; Método alternativo de análise; Calibração; Quantificação; Pré-Misturas enriquecidas; Micronutrientes.

Abstract

Nowadays, the quality of food products has become of increasing demand in international markets. In the food industry, it is current practice to use minerals and vitamins fortification in infant nutrition products in order to achieve the infants' and young children's nutritional needs. For this reason it is imperious to ensure the quality of these products. This quality control can be made on-line using alternative analytical methods, enabling, on the one hand, the permanent control of essential production parameters and on the other a decreased release time of the product and of the amount of product to rework.

The main objective of this work was to study X-Ray Fluorescence Spectroscopy and Fourier Transform Near Infrared Spectroscopy as two alternative analytical methods to Atomic Absorption Spectrophotometry in calcium and iron quantification and Potentiometric Titration, in vitamin C quantification, respectively, in infant nutrition products.

To develop robust mathematical models, were used samples from the product line and samples prepared in laboratory, covering a wide range of concentrations. The total number of used samples for each calibration curve was approximately thirty-three.

Twenty-two calibration models were developed and there was no possibility to develop five models, two for calcium and three for iron, since all the conditions of applicability of the linear regression were not ensure. In approximately 86% of all cases, the correlation coefficient was bigger than 0.90, showing that the predicted results were very similar to the reference results.

With these results it was possible to conclude that the two alternative analytical methods have a good correlation with the reference analytical methods, for calcium, iron and vitamin C in infant nutrition products. In order to conclude if these methods are, indeed, a valid alternative for the reference analytical methods, there's necessary to perform the validation of the current models.

Keywords: Quality control; X-Ray Fluorescence Spectroscopy and Fourier Transform Near Infrared Spectroscopy; Alternative analytical methods; Calibration; Quantification; Enriched Premixes; Micronutrients.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Engenheiro Nelson Silva pelo seu apoio durante todo o estágio, pelas oportunidades que me deu ao longo desta jornada, bem como pela análise crítica e científica do presente trabalho.

Ao meu Coorientador, Mestre Hugo Costa, pela incansável disponibilidade, pelo próximo acompanhamento da evolução do trabalho, pelas discussões indispensáveis à sua progressão, pelo companheirismo e, também, pela análise crítica e científica do presente trabalho.

À Dra. Fátima Sodré pelo interesse demonstrado na progressão das atividades, bem como pela análise crítica e científica do presente trabalho.

A todos os colaboradores do Departamento de Controlo de Qualidade, pelos momentos de boa disposição proporcionados, pelo apoio essencial desde o primeiro dia e um agradecimento especial à Fátima Vieira, à Andreia Paço, ao Pedro Reis e ao Hugo Ferreira pelo companheirismo e pela ajuda indispensável na análise laboratorial de amostras, sem os quais não teria sido possível a sua execução.

A todos os colaboradores do Setor III, pela prestável ajuda em diferentes momentos e um agradecimento especial ao Ricardo Teixeira pela disponibilidade e apoio indispensáveis ao longo de todo o meu percurso na Nestlé.

A todos os operadores pela forma calorosa como me trataram e me ajudaram quando assim o solicitei e pelos momentos de boa disposição proporcionados.

À Professora Doutora Ana Gomes pelo carinho, amizade e incentivo que me fortaleceram em momentos mais difíceis desta jornada, pela confiança em mim depositada e por me ter orientado e proporcionado este estágio na Nestlé.

À Professora Doutora Alcina Bernardo pelo apoio demonstrado ao longo da coordenação do mestrado e por me ter proporcionado a realização deste estágio na Nestlé.

Ao Professor Doutor Rui Barros pela prontidão, disponibilidade e pelo indispensável e incansável apoio na análise estatística dos resultados deste trabalho.

Aos meus queridos pais pelo amor manifestado a cada momento, pelo incondicional e incomparável apoio e compreensão presentes desde sempre, pela forma como conseguiram transformar dias desesperantes e tristes em dias rejuvenescedores e fortalecedores que permitiram que esta caminhada fosse mais suave e profícua e, o que mais me alenta e ampara, por acreditarem em mim.

Ao meu querido irmão pelo amor, pelo indispensável apoio em momentos decisivos e pelo orgulho demonstrado a cada sucesso por mim alcançado ao longo desta jornada. Agradeço, também, à Maria João, que a par do André, me incentivou em momentos mais críticos desta etapa tão importante para mim.

À minha avó Dinda, por toda a preocupação, encorajamento e amor que me incentivaram ao longo desta fase e pelas manifestações de orgulho a cada meta por mim alcançada.

Aos meus avós Né e Rui pelo apoio, incentivo e amor demonstrados ao longo de toda a jornada, indispensáveis a esta caminhada.

Aos meus amigos mais próximos, pela compreensão que demonstraram após repetidas ausências da minha parte, pela amizade insubstituível que me fortalece a cada dia e por me fazerem sentir que apesar da distância e, por vezes, do silêncio o seu apoio e orgulho se manterão inalterados.

A todos os que, direta ou indiretamente, colaboraram para a concretização do presente trabalho.

Índice

Lista de figuras	xiv
Lista de tabelas	xviii
Abreviaturas	xx
1. Introdução.....	1
1.1. A garantia e o controlo da qualidade.....	1
1.2. A importância da garantia de qualidade nos produtos de Nutrição Infantil.....	2
1.3. A importância do cálcio, ferro e vitamina C na alimentação infantil.....	2
1.4. Realidade numa empresa internacional como a Nestlé.....	6
1.5. Importância do controlo na linha de produção	7
1.6. Objetivos.....	8
2. Estado da Arte	9
2.1. Métodos de Análise de Referência	9
2.1.1. Espectrofotometria de Absorção Atómica (EAA)	9
2.1.2. Doseamento de Ácido ascórbico por Titulação Potenciométrica.....	11
2.2. Métodos Alternativos de Análise	11
2.2.1. Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X.....	12
2.2.2. Espectroscopia de Infravermelho Próximo (NIR)	17
3. Materiais e Métodos	21
3.1. Tipologia e concepção das amostras objecto de estudo	21
3.2. Amostras Experimentais.....	22
3.2.1. Planeamento da elaboração das amostras.....	22
3.2.2. Preparação das amostras experimentais	23
3.3. Métodos de Análise de Referência	24
3.3.1. Procedimento de Espectrofotometria de Absorção Atómica para determinação de cálcio e ferro	24
3.3.1.1. Preparação de Soluções	24
3.3.1.2. Preparação de amostras para absorção atómica	25
3.3.1.3. Leitura de amostras no espectrofotómetro.....	26
3.3.2. Procedimento para doseamento de ácido ascórbico por Titulação Potenciométrica ...	27
3.3.2.1. Preparação de Soluções	28

3.3.2.2.	Procedimento para a calibração	28
3.3.2.3.	Preparação de amostras para titulação potenciométrica	29
3.3.2.4.	Análise, por titulação potenciométrica, das amostras preparadas.....	29
3.4.	Métodos de Análise Alternativos	30
3.4.1.	Procedimento para análise das amostras para análise por XRF	30
3.4.1.1.	Preparação da amostra	30
3.4.1.2.	Análise das amostras no aparelho XRF	31
3.4.2.	Procedimento para leitura das amostras para análise por FT-NIR.....	31
3.4.2.1.	Preparação da amostra	32
3.4.2.2.	Análise das amostras no aparelho NIR	32
3.5.	Análise Estatística dos Dados	33
4.	Resultados e Discussão	34
1.1.	Amostras Experimentais.....	34
1.2.	Resultados obtidos pelos métodos de análise	44
2.	Conclusões Gerais	54
3.	Bibliografia	55
4.	Apêndices	60

Lista de figuras

Figura 1 – Esquema representativo da análise por Espectrofotometria de Absorção Atômica por chama (adaptado de Skoog <i>et al.</i> , 2004).....	10
Figura 2 – Reação entre o ácido ascórbico e o corante 2,6 - diclorofenolindofenol na sua forma oxidada, com formação de corante incolor na sua forma reduzida e de ácido dehidroascórbico (adaptado de Anónimo, 2009).....	11
Figura 3 – Localização dos raios-x (<i>X-rays</i>) no espectro eletromagnético, apresentado como uma função do comprimento de onda, em nanómetros, da frequência, em hertz, e da energia, em eletrão volts. (adaptado de Seibert, 2004).	12
Figura 4 – Ionização e reorganização atômica por transição radioativa (Buckman-Ellis, 2004).....	13
Figura 5 – <i>Designs</i> possíveis de um tubo de raio-x (Brouwer, 2013).....	14
Figura 6 – <i>Design</i> básico de um detetor de estado sólido (Brouwer, 2013).....	15
Figura 7 – Esquema representativo do funcionamento do aparelho XRF (Thermo Scientific, n.d.)....	16
Figura 8 – Sobreposições e Combinações de ligações características da espectroscopia de NIR (adaptado de Bergles e Yang, 2009).....	18
Figura 9 – Esquema representativo da Espectroscopia por Refletância Difusa no Infravermelho com Transformada de <i>Fourier</i> (Herron <i>et al.</i> , 2013).....	19
Figura 10 – Procedimento para retirar a pastilha do conjunto metálico.	31
Figura 11 – Comparação gráfica entre as concentrações de cálcio e vitamina C obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha láctea Simples.....	34
Figura 12 – Comparação gráfica entre as concentrações de ferro obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha láctea Simples.....	35
Figura 13 – Comparação gráfica entre as concentrações de cálcio e vitamina C obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha láctea com Pera.....	35
Figura 14 – Comparação gráfica entre as concentrações de ferro obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha láctea com Pera.....	36
Figura 15 – Comparação gráfica entre as concentrações de cálcio e vitamina C obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha láctea com Maçã.....	36
Figura 16 – Comparação gráfica entre as concentrações de ferro obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha láctea com Maçã.....	37

Figura 17 – Comparação gráfica entre as concentrações de cálcio e vitamina C obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha láctea com Tâmaras.....	37
Figura 18 – Comparação gráfica entre as concentrações de ferro obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha láctea com Tâmaras.....	38
Figura 19 – Comparação gráfica entre as concentrações de cálcio e vitamina C obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha láctea com Banana.....	38
Figura 20 – Comparação gráfica entre as concentrações de ferro obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha láctea com Banana.....	39
Figura 21 – Comparação gráfica entre as concentrações de cálcio e vitamina C obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha láctea Multifrutos.....	39
Figura 22 – Comparação gráfica entre as concentrações de ferro obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha láctea Multifrutos.....	40
Figura 23 – Comparação gráfica entre as concentrações de cálcio e vitamina C obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha láctea com Frutos.....	40
Figura 24 – Comparação gráfica entre as concentrações de ferro obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha láctea com Frutos.....	41
Figura 25 – Comparação gráfica entre as concentrações de cálcio e vitamina C obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha não láctea Multifrutos.....	41
Figura 26 – Comparação gráfica entre as concentrações de ferro obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha não láctea Multifrutos.....	42
Figura 27 – Comparação gráfica entre as concentrações de cálcio e vitamina C obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha não láctea Simples.....	42

Figura 28 – Comparação gráfica entre as concentrações de ferro obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha não láctea Simples.....	43
Figura 29 – Curva de Calibração de cálcio, para Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea Simples.....	60
Figura 30 – Curva de Calibração de vitamina C, para Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea Simples.	60
Figura 31 – Curva de Calibração de cálcio, para Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea com Pera.	61
Figura 32 – Curva de Calibração de ferro, para Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea com Pera.....	61
Figura 33 – Curva de Calibração de vitamina C, para Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea com Pera.....	61
Figura 34 – Curva de Calibração de cálcio, para Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea com Maçã.....	62
Figura 35 – Curva de Calibração de ferro, para Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea com Maçã.....	62
Figura 36 – Curva de Calibração de vitamina C, para Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea com Maçã.....	62
Figura 37 – Curva de Calibração de cálcio, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea com Tâmaras.....	63
Figura 38 – Curva de Calibração de ferro, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea com Tâmaras.....	63
Figura 39 – Curva de Calibração de vitamina C, para Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea com Tâmaras.....	63
Figura 40 – Curva de Calibração de cálcio, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea Multifrutos.....	64
Figura 41 – Curva de Calibração de ferro, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea Multifrutos.....	64
Figura 42 – Curva de Calibração de vitamina C, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea Multifrutos.....	64
Figura 43 – Curva de Calibração de ferro, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea com Banana.....	65
Figura 44 – Curva de Calibração de vitamina C, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea com Banana.....	65
Figura 45 – Curva de Calibração de ferro, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea com Frutos.....	66
Figura 46 – Curva de Calibração de vitamina C, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea com Frutos.....	66

Figura 47 – Curva de Calibração de cálcio, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Não Láctea Multifrutos.....	67
Figura 48 – Curva de Calibração de vitamina C, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Não Láctea Multifrutos.	67
Figura 49 – Curva de Calibração de cálcio, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Não Láctea Simples.	68
Figura 50 – Curva de Calibração de vitamina C, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Não Láctea Simples.	68

Lista de tabelas

Tabela 1 – Grupos de Pré-Misturas divididos consoante o <i>Vitamin Premix</i> e a fonte de ferro usados.....	22
Tabela 2 – Compostos, material e equipamentos utilizados na elaboração das pré-misturas em laboratório.....	23
Tabela 3 – Reagentes, material e equipamentos utilizados na Espectrofotometria de Absorção Atômica.....	24
Tabela 4 – Condições de operação usadas na digestão das amostras.....	25
Tabela 5 – Reagentes, materiais e equipamentos utilizados na Titulação Potenciométrica.....	27
Tabela 6 – Materiais e equipamentos utilizados na preparação de amostras para análise de Espectroscopia de XRF.....	30
Tabela 7 – Condições de operação ótimas para análise de cálcio e ferro em pré-misturas constituintes de produtos de nutrição infantil.....	31
Tabela 8 – Materiais e equipamentos utilizados na preparação de amostras para análise de Espectroscopia de NIR.....	32
Tabela 9 – Médias dos desvios padrão relativos (%) dos duplicados para as pré-misturas estudadas, obtidas na quantificação de cálcio, ferro e vitamina C.....	45
Tabela 10 – Médias do erro percentual relativo, em módulo, obtido para os valores de referência e alternativos médios obtidos para cálcio, ferro e vitamina C para cada uma das pré-misturas estudadas.....	46
Tabela 11 – Modelos de regressão linear entre métodos de análise de referência e métodos de análise alternativos para medição de cálcio, ferro e vitamina C na pré-mistura utilizada em Farinha Láctea Simples.....	47
Tabela 12 – Modelos de regressão linear entre métodos de análise de referência e métodos de análise alternativos para medição de cálcio, ferro e vitamina C na pré-mistura utilizada em Farinha Láctea com Pera.....	48
Tabela 13 – Modelos de regressão linear entre métodos de análise de referência e métodos de análise alternativos para medição de cálcio, ferro e vitamina C na pré-mistura utilizada em Farinha Láctea com Maçã.....	48
Tabela 14 – Modelos de regressão linear entre métodos de análise de referência e métodos de análise alternativos para medição de cálcio, ferro e vitamina C na pré-mistura utilizada em Farinha Láctea com Tâmaras.....	49
Tabela 15 – Modelos de regressão linear entre métodos de análise de referência e métodos de análise alternativos para medição de cálcio, ferro e vitamina C na pré-mistura utilizada em Farinha Láctea Multifrutos.....	50
Tabela 16 – Modelos de regressão linear entre métodos de análise de referência e métodos de análise alternativos para medição de ferro e vitamina C na pré-mistura utilizada em Farinha Láctea com Banana.....	50

Tabela 17 – Modelos de regressão linear entre métodos de análise de referência e métodos de análise alternativos para medição de ferro e vitamina C na pré-mistura utilizada em Farinha Láctea com Frutos.....	51
Tabela 18 – Modelos de regressão linear entre métodos de análise de referência e métodos de análise alternativos para medição de cálcio, e vitamina C na pré-mistura utilizada em Farinha Não Láctea Multifrutos.....	52
Tabela 19 – Modelos de regressão linear entre métodos de análise de referência e métodos de análise alternativos para medição de cálcio e vitamina C na pré-mistura utilizada em Farinha Não Láctea Simples.....	53

Abreviaturas

AI	Adequate Intake
cm	Centímetro
Cps	Contagens por segundo
DCPIP	2,6-diclorofenol-indofenol
DDR	Dose Diária Recomendada
DRI	Dietary Reference Intakes
EAA	Espetrofotometria de Absorção Atômica
EAR	Estimated Average Requirement
EDXRF	Energy Dispersive X-Ray Fluorescence
EFSA	European Food Safety Authority
EPI	Equipamento de Proteção Individual
EURRECA	EUROpean micronutrient RECommendations Aligned
g	Grama
GHz	Giga Hertz
kV	Quilovolt
keV	Quilo-eletrão volt
L	Litro
M	Molar
MCA	Multi Channel Analyzer
mg	Miligrama
mL	Mililitro
M/V	Percentagem massa volume
MΩ	Miliohm
MWIR	Medium Wavelength Infrared
NIR	Near Infrared
nm	Nanómetro
Nm	Newton.metro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PLS	Partial Least Square
ppb	Parte por bilhão
ppm	Parte por milhão
PMT	Photomultiplier tube
RDA	Recommended Dietary Allowance
ROI	Region of Interest
RSD	Relative Standard Deviation
s	Segundo
SD	Standard Deviation

Ton	Tonelada
THz	Tera Hertz
UL	Tolerable Upper Intake Level
VDR	Valor Diário de Referência
V_f	Volume Final
V/V	Porcentagem em Volume
W	Watts
WDXRF	Wavelength Dispersive X-Ray Fluorescence
XRF	X-Ray Fluorescence
μA	Micro-Ampere
μm	Micrometro
μg	Micrograma

1. Introdução

1.1. A garantia e o controlo da qualidade

A elevada qualidade dos produtos alimentares tem-se tornado uma exigência cada vez mais presente nos mercados mundiais dos dias de hoje. Para o consumidor em geral, a qualidade e a segurança deste tipo de produtos assume uma maior importância, sendo estes atributos cada vez mais valorizados no ato de compra. Dados os contornos que os conceitos de segurança e qualidade de produtos alimentares têm assumido na sociedade de hoje, o consumidor espera que o leque de produtos à sua escolha seja seguro e de boa qualidade. Assim sendo, as entidades responsáveis pela produção e desenvolvimento de géneros alimentícios têm um papel primordial ao serem capazes de responder às expectativas do consumidor.

Segundo a norma ISO 9000, “qualidade” é definida como o “grau de satisfação de requisitos dado por um conjunto de características intrínsecas”. A característica de qualidade é mensurável, podendo ser caracterizada numa escala de qualificação qualitativa ou quantitativa. Assim, de forma a elevar o padrão de qualidade e objetivando ocupar sempre o máximo da escala, muitas organizações optam por implementar um sistema de gestão de qualidade. A aquisição e a manutenção de um destes sistemas promovem a melhoria do desempenho e o caminho para o sucesso. De acordo com a norma referida anteriormente, para uma eficaz implementação de um sistema de gestão de qualidade é necessário seguir alguns princípios fundamentais, os quais: a focalização no cliente; a liderança; o envolvimento das pessoas; a abordagem por processos; a abordagem da gestão como um sistema; a melhoria contínua; a abordagem à tomada de decisões baseadas em factos; relações mutuamente benéficas com fornecedores. Numa empresa multinacional como a Nestlé, nomeadamente no seu contexto fabril, a aplicação destes oito princípios é fundamental uma vez que facilitará o seu funcionamento com sucesso, permitindo um posicionamento de liderança.

Dois conceitos, também muito importantes, integrados nesta gestão da qualidade são a garantia e o controlo da qualidade. A sua implementação significa que estão a ser tomadas medidas que permitem que os requisitos de qualidade sejam sistemática e devidamente cumpridos, gerando confiança ao consumidor.

Para isto ser exequível e concordante com os oito princípios atrás, é fundamental o acompanhamento e o controlo desde o início ao final da cadeia de fabrico de um produto alimentar, ou seja é imprescindível a gestão de todos os processos envolvidos (ISO, 2005). Como referido atrás, a norma ISO 9000 defende que a implementação de um sistema de gestão de qualidade implica a adoção de uma abordagem por processos, isto é, a adoção de um sistema que identifique e consiga gerir todas as atividades que estão interligadas num processo, o qual vai permitir um controlo mais eficaz e específico proporcionando a interligação dos processos individuais, objetivando a otimização do processo global.

1.2. A importância da garantia de qualidade nos produtos de Nutrição Infantil

A alimentação no início de vida é de extrema importância, na qual o leite materno é o alimento de eleição nos primeiros meses de vida sendo, na verdade, recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) o seu consumo exclusivo durante os primeiros seis meses de vida (WHO, n.d.). A partir dos 4 aos 6 meses de vida, o bebé deve iniciar o processo de diversificação alimentar (Guerra *et al.*, 2012). Nesta fase é imprescindível a inserção de outros alimentos na dieta do latente, uma vez que os requisitos para o desenvolvimento a nível neurológico, sensorial, motor e social são cada vez mais exigentes (Mahan e Escott-Stump, 2008). Desta forma, e uma vez que o aleitamento materno em exclusivo é insuficiente para colmatar as necessidades nesta fase, é muito importante adequar o aporte nutricional à evolução do latente, principalmente em macronutrientes, nomeadamente proteínas, lípidos e hidratos de carbono, bem como em micronutrientes como cálcio, ferro, zinco, flúor e algumas vitaminas como a A, D, B₁₂ e K (Guerra *et al.*, 2012; Mahan e Escott-Stump, 2008)

A diversificação alimentar é muitas vezes iniciada com a introdução de farinhas de cereais, sendo possível optar por farinhas lácteas ou farinhas não lácteas (DRSP, 2006; Guerra *et al.*, 2012). As farinhas lácteas têm leite na sua constituição e devem ser preparadas com água, ao passo que as não lácteas não têm leite na sua composição e, portanto, devem ser preparadas com o leite que o bebé habitualmente consome (Guerra *et al.*, 2012).

O Regulamento (UE) N.º 609/2013 contém conceitos informativos e estabelece os requisitos quanto à composição de algumas categorias de alimentos, nomeadamente “fórmulas para latentes e fórmulas de transição” e, também, “alimentos transformados à base de cereais e alimentos para bebés” (JOUE, 2013).

De maneira a garantir que as necessidades dos latentes e das crianças jovens sejam colmatadas através da sua alimentação, que nesta fase do ciclo de vida se baseia nas farinhas lácteas/não lácteas e no leite, é premente a garantia da qualidade destes produtos. Assim, há que garantir que o teor nutricional destes produtos alimentares é efetivamente o adequado e que todos os componentes estão sistematicamente nas concentrações devidas. Para tal, há também legislação nacional, especificamente o Dec. Lei n.º 53/2008 de 25 de Março, que transpõe a Diretiva 2006/125/CE para a ordem jurídica interna, que “estabelece o regime jurídico aplicável aos géneros alimentícios para utilização nutricional especial que satisfaçam os requisitos específicos relativos aos latentes e crianças de pouca idade saudáveis e destinados a latentes em fase de desmame e a crianças de pouca idade em suplemento das suas dietas e ou adaptação progressiva à alimentação normal.”.

1.3. A importância do cálcio, ferro e vitamina C na alimentação infantil

As vitaminas e os minerais são nutrientes imprescindíveis ao bom desenvolvimento do ser humano, tendo especial importância no início do ciclo de vida. Todos os nutrientes são necessários

em doses singulares havendo, portanto, recomendações acerca do seu valor para cada fase do ciclo de vida. A *Food and Nutrition Board, Institute of Medicine* definiu as *Dietary Reference Intakes* (DRIs), que constam em valores de referência para a ingestão de nutrientes para grupos de indivíduos (Mahan e Escott-Stump, 2008). O conceito de DRIs abrange outros 4 conceitos mais particulares: a Necessidade Média Estimada (EAR), a Ingestão Diária Recomendada (RDA), a Ingestão Adequada (AI) e o Limite Superior Tolerável de Ingestão (UL) (Institute of Medicine Food and Nutrition Board, 2006). Contudo, existem ainda conceitos como os Valores Diários de Referências (VDRs) e as Doses Diárias Recomendadas (DDR), baseados nos quatro conceitos apresentados anteriormente, que são por norma os que estão disponíveis na rotulagem nutricional da maioria dos produtos alimentares portugueses bem como em produtos de outros países. Assim, os VDRs traduzem os valores de energia, proteínas, hidratos de carbono (simples e complexos), lípidos (gordura total e gordura saturada), fibras, açúcares e sódio/sal que a generalidade das pessoas é aconselhada a ingerir diariamente, no âmbito de uma dieta saudável (Institute of Medicine Food and Nutrition Board, 2006). As DDRs traduzem as doses de vitaminas e minerais estimadas para colmatar as necessidades de um grupo de indivíduos (Institute of Medicine Food and Nutrition Board, 2006). As DDRs, podem ser consultadas na Directiva 2008/100/CE, a qual se refere “à rotulagem nutricional dos géneros alimentícios, no que diz respeito às doses diárias recomendadas, aos fatores de conversão de energia e às definições” (Institute of Medicine Food and Nutrition Board, 2006).

Os requisitos nutricionais dos latentes (crianças com menos de doze meses de idade) e das crianças jovens ou de pouca idade (crianças com idade compreendida entre um e três anos) são muito particulares devido a vários fatores, entre eles, a taxa de crescimento, a energia despendida em atividade, as necessidades metabólicas basais e a interação dos nutrientes consumidos (JOUE, 2006; Mahan e Escott-Stump, 2008).

A Agência Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) é o órgão responsável pelas recomendações em micronutrientes na Europa, havendo ainda a *EUROpean micROnutrient RECommendations Aligned (EURRECA)* que colabora com a EFSA (Guerra *et al.*, 2012). De entre os micronutrientes, esta rede europeia considera como primordiais o ferro, o ácido fólico e a vitamina D (Guerra, 2012). Contudo, há outros micronutrientes que também devem ser alvo de especial atenção por terem funções muito importantes no desenvolvimento do bebé, entre eles o cálcio, o zinco, a vitamina C e a vitamina K (Guerra *et al.*, 2012; Mahan e Escott-Stump, 2008; Olivares *et al.*, 1999).

Nos próximos parágrafos será dado particular enfoque aos micronutrientes estudados neste trabalho, o ferro, o cálcio e a vitamina C.

A importância do ferro nesta fase do ciclo de vida advém do facto de a deficiência neste mineral ser o distúrbio nutricional mais comum em todo o mundo, também frequente em Portugal, e o maior causador de anemia durante a infância e a gravidez (Mahan e Escott-Stump, 2008). Desde a década de 70, início da fortificação de fórmulas infantis com ferro, a taxa de anemia por deficiência em ferro caiu drasticamente (American Academy of Pediatrics, 1999). A deficiência em ferro tem principalmente consequências a nível cognitivo, estando demonstrado por vários estudos que concentrações baixas de hemoglobina no primeiro ano de vida podem repercutir-se num desenvolvimento motor debilitado e que a sua deficiência crónica durante a infância pode provocar

distúrbios comportamentais na adolescência (Mahan e Escott-Stump, 2008). O ferro proveniente da dieta alimentar é maioritariamente ferro heme, sendo encontrado em carne, fígado, moluscos, ostras, peixes como sardinhas enlatadas, salmão e atum. Contudo, o ferro não heme é também encontrado em espinafres, tofu, abóbora, entre outros (Mahan e Escott-Stump, 2008). Há, no entanto, alguns constituintes dos alimentos, como os fitatos, presentes em cereais, e alguns compostos fenólicos, existentes nos chás e café, que inibem a absorção deste mineral por, por exemplo, competirem para os locais de absorção do ferro ou por se ligarem ao mineral e inviabilizarem a sua absorção (Mahan e Escott-Stump, 2008; FAO/WHO, 1998). De acordo com o Dec. Lei n.º 53/2008 de 25 de Março, o valor de referência de ferro nos alimentos destinados a latentes e crianças de pouca idade é de 6 mg/100g de produto. A excreção do excesso de ferro por parte do organismo ocorre essencialmente por descamação epitelial, secreções intestinais e sangramento menstrual, não sendo excretado pela urina por exemplo, pelo que esta particularidade deve ser tida em conta aquando da ingestão de alimentos ricos neste mineral (Mahan e Escott-Stump, 2008). Assim, a toxicidade deste mineral pode provocar danos em vários órgãos, como o fígado e os rins, a nível hormonal, entre outros. Desta forma, há a necessidade de se estabelecer limites para a sua presença nos alimentos. Assim, segundo documentação interna da Nestlé, os limites para o ferro podem variar entre 3,85-20 mg de ferro por 100 g de produto terminado, considerando todas as farinhas lácteas e não lácteas.

O cálcio tem um papel importante na formação e desenvolvimento do sistema ósseo, intervém no sistema muscular, em particular no processo de contração muscular e, ainda, no sistema nervoso, especificamente na transmissão dos impulsos nervosos (Guerra *et al.*, 2012). Tendo em conta a composição corporal, é o quinto elemento mais abundante do corpo humano, constituindo cerca de 1,9% do peso corporal (FAO/WHO, 1998). Para poder usufruir de uma alimentação rica em cálcio, deve optar-se por consumir leite, iogurtes, queijo, couve, feijão-frade, feijão enlatado, tofu, entre outros (Mahan e Escott-Stump, 2008). De acordo com o Dec. Lei n.º 53/2008 de 25 de Março, bem como as *guidelines* internacionais, o valor de referência de cálcio nos alimentos destinados a latentes e crianças de pouca idade é de 400 mg/100g de produto. Contudo, este valor pode variar, consoante a fonte do leite em questão, caso a criança consuma leite materno, as necessidades não são tão elevadas, sendo próximas de 300 mg/dia (FAO/WHO, 1998). De acordo com documentação interna da Nestlé, os limites para o cálcio podem variar entre 98-675 mg de cálcio por 100 g de produto terminado, considerando todas as farinhas lácteas e não lácteas.

A vitamina C, vitamina hidrossolúvel, desempenha funções ao nível do metabolismo proteico, da biossíntese de moléculas como a L-carnitina e alguns neurotransmissores e é um antioxidante muito potente, dada a sua capacidade de doar eletrões, função indispensável no combate ao processo de oxidação (Mahan e Escott-Stump, 2008; FAO/WHO, 1998). Esta vitamina tem a particularidade de melhorar a absorção do ferro não heme no organismo (NIH, n.d.; Mahan e Escott-Stump, 2008; FAO/WHO, 1998). A vitamina C é um micronutriente encontrado maioritariamente em frutas e vegetais. Frutos como kiwi, laranja, toranja, limão, melão, melancia ou cerejas e vegetais como brócolos, repolho, couve-de-bruxelas, couve ou tomates têm concentrações variáveis e consideráveis desta vitamina (Mahan e Escott-Stump, 2008; FAO/WHO, 1998). O conteúdo de vitamina C nos alimentos é influenciado por vários determinantes, entre eles o tempo de vida útil, o

tempo de armazenamento, as práticas culinárias bem como a coloração da água (FAO/WHO, 1998). Segundo o Dec. Lei n.º 53/2008 de 25 de Março e as *guidelines* internacionais, o valor de referência desta vitamina nos alimentos destinados a lactentes e crianças de pouca idade é de 25 mg/100g de produto (FAO/WHO, 1998). Apesar dos seus benefícios indiscutíveis, níveis de consumo elevados não são aconselhados. A toxicidade por vitamina C está normalmente associada a alterações a nível gastrointestinal e renal (FAO/WHO, 1998). A gama de concentrações de vitamina C em produto terminado, de acordo com documentação interna da Nestlé, pode variar entre 21-106 mg de vitamina C por 100 g de produto terminado, considerando todas as farinhas lácteas e não lácteas.

De forma a contrariar a tendência de deficiência em alguns micronutrientes uma das estratégias utilizadas pela indústria alimentar é a fortificação de alimentos. A fortificação de alimentos trata-se da adição a alimentos de um ou mais nutrientes essenciais, que podem ou não ser constituintes normais do alimento, com o objetivo de prevenir ou corrigir uma deficiência em um ou mais nutrientes demonstrada numa população ou num grupo específico de indivíduos (Allen e Benoist, 2006).

Para a fortificação em ferro podem ser usados diversos compostos deste elemento, os quais têm diferenças a nível de conteúdo em ferro, biodisponibilidade relativa e custo (Allen e Benoist, 2006). Os compostos de ferro solúveis em água são os que melhores resultados apresentam em termos de biodisponibilidade, contudo provocam alguns efeitos negativos como alterações sensoriais, a nível de cor e sabor, no produto no qual estão a ser utilizados (Hurrell, 2002). Pelo contrário, os compostos de ferro não solúveis em água não provocam estes efeitos desagradáveis mas, apesar de haver estudos com conclusões controversas, também não apresentam uma biodisponibilidade tão efetiva como os compostos anteriores (Davidsson *et al.*, 2009). Os compostos usados nos produtos de nutrição infantil da Nestlé são essencialmente o fumarato de ferro e o pirofosfato de ferro, com conteúdo em ferro de 33% e 25% e biodisponibilidade relativa de 100 e 21-74, respetivamente (Buchini, 2010; Allen e Benoist, 2006). Em termos de custos por miligrama de ferro, o pirofosfato de ferro custa aproximadamente o dobro do fumarato de ferro (Buchini, 2010; Allen e Benoist, 2006).

Na fortificação de cálcio, o composto utilizado na formulação dos produtos Nestlé é o carbonato de cálcio, o qual tem um conteúdo em cálcio de 40%. O custo do carbonato de cálcio é bastante baixo quando comparado com outros fortificantes (Allen e Benoist, 2006). Uma das desvantagens associadas à adição de cálcio nos alimentos é a baixa solubilidade, variável entre 10% a 30%, contudo estes valores são coincidentes com os da absorção do cálcio naturalmente presente nos alimentos, pelo que não deve ser considerado um entrave aquando da sua adição nos alimentos (Allen e Benoist, 2006). Outra das características deste mineral é a sua capacidade em inibir a absorção de ferro nos alimentos quando presente em grandes concentrações (Allen e Benoist, 2006). Contudo, este facto pode ser colmatado, ou parcialmente colmatado, com a adição de vitamina C que tem a ação oposta.

A fortificação de vitamina C pode ser feita com vários objetivos, entre eles para melhorar a estabilidade de outros micronutrientes adicionados, como por exemplo a vitamina A, ou ainda para potenciar a absorção de ferro, como referido anteriormente (Allen e Benoist, 2006). Contudo, esta vitamina carece de algumas precauções durante todo o processo, uma vez que é sensível a vários

fatores, sendo instável na presença de temperaturas elevadas, luz, metais e humidade e sofre oxidação irreversível na presença de oxigénio (Allen e Benoist, 2006). A fortificação de cereais com ácido ascórbico tem demonstrado efeitos positivos (Allen e Benoist, 2006).

1.4. Realidade numa empresa internacional como a Nestlé

A Nestlé nasce em Portugal, sob a alçada Egas Moniz, no ano de 1923, em terras de Santa Maria de Avanca. Desde então tem-se tornado numa empresa de confiança para o consumidor, sendo uma empresa com crescimento de vendas notório, desenvolvendo produtos passíveis de serem utilizados durante todo o ciclo de vida, desde o nascimento do bebé. A Fábrica de Avanca produz, atualmente, produtos alimentares designadamente farinhas infantis, cereais para toda a família, cereais de pequeno-almoço, produtos solúveis com e sem café, aglomerados de leite em pó, produtos de base mistura a seco e natas refrigeradas.

Um dos princípios corporativos empresariais da Nestlé é precisamente a garantia da qualidade e segurança de todos os seus produtos (Anónimo, 2011). A seleção dos produtos Nestlé é a garantia, para o consumidor, da escolha de um produto seguro, que cumpre com as regulamentações e que satisfaz elevados padrões de qualidade. Todos os departamentos da Fábrica, desde a Produção, à Garantia de Qualidade, aos Serviços Técnicos, à Logística, aos Serviços Administrativos, aos Sistemas de Informação, à Programação e ao Serviço Pessoal, têm um papel primordial na contiguidade da melhoria contínua nesta área.

O Departamento de Garantia de Qualidade é constituído por três laboratórios, com funções específicas tais como análises físico-químicas, análises microbiológicas e análises sensoriais aos produtos em diferentes fases de produção e, ainda, análises e testes a material de embalagem.

Relativamente às análises no laboratório Físico-Químico, de um modo geral, mas dependendo do produto, são efetuadas análises a nível de macronutrientes, nomeadamente determinação de matéria gorda, de proteínas e de açúcares totais, a nível de micronutrientes, especificamente determinação de vitamina C, vitamina B₂, ferro e cálcio, e ainda determinação de humidade, micotoxinas (em farinhas) e cafeína (no caso dos cafés solúveis). Fora do âmbito das análises a produtos alimentares, são efetuadas análises a águas.

Quanto ao laboratório de Microbiologia, podem-se destacar dois campos de ação diferentes, um relativo a microbiologia geral e outro à microbiologia patogénica. Neste laboratório, para além de analisarem amostras procedentes das diferentes fases de produção, também se analisam amostras provenientes do ambiente fabril, nomeadamente de materiais, equipamentos e superfícies. No âmbito da microbiologia patogénica, efetuam-se análises à presença de *Salmonella*.

Na degustação dos produtos alimentares, avaliam-se produtos terminados e matérias-primas a diferentes níveis. De um modo geral, as farinhas láteas e não láteas e os cereais de pequeno-almoço são avaliados em seco e seguindo rigorosamente o procedimento de preparação de acordo com a embalagem, quanto ao aspeto, cheiro, sabor e textura na boca. Os leites têm praticamente os mesmos parâmetros de avaliação a seco e em dissolução e as natas avaliam-se antes e depois de batidas.

1.5. Importância do controlo na linha de produção

Na Nestlé, o controlo de qualidade é feito em diversas fases do ciclo de produção, nomeadamente na receção das matérias-primas, durante o processo de fabrico, no produto terminado e ainda é avaliada a estabilidade das suas características durante o seu ciclo de vida.

Como referido anteriormente, o Departamento de Garantia de Qualidade, nomeadamente o laboratório físico-químico faz diariamente diversos tipos de análises, quer em produto terminado, quer em algumas matérias-primas, quer em produtos semi-fabricados. Para além do controlo diário, há, também, um planeamento mensal, trimestral e semestral. A realização sistemática destas análises, nas várias fases de produção, permite que os produtos sejam liberados com a garantia de que todos os parâmetros exigíveis estão dentro dos valores aceitáveis e, assim, que seja assegurada a conformidade do produto com o estabelecido na declaração final do mesmo, bem como com o descrito no respetivo rótulo. Contudo, algumas das análises efetuadas em laboratório são um pouco demoradas, pelo que a existência de uma metodologia de análise passível de ser utilizada na linha de produção é uma mais-valia. Assim, de forma a otimizar recursos, a implementação em plena linha de produção de metodologias analíticas alternativas capazes de reproduzir fielmente os resultados obtidos por metodologias analíticas de referência é imperativa numa fábrica cujo objetivo é o caminho para a excelência. A quantificação de minerais, como cálcio e ferro, por Espetroscopia de Fluorescência por Raios X (XRF) e de vitamina C por Espetroscopia de Infravermelho Próximo (NIR) são exemplos de métodos alternativos de análise ao doseamento destes minerais por Espectrofotometria de Absorção Atómica (EAA) e da vitamina C por Titulação Potenciométrica, respetivamente. A existência de uma metodologia com estas características permite a diminuição do tempo de liberação do produto, uma vez que os resultados são praticamente imediatos, bem como a diminuição da quantidade de produto a retrabalhar, pois poderão ser detetados erros numa etapa precoce (Costa, 2011). Os produtos estudados neste trabalho denominam-se Pré-Misturas, as quais são apenas misturas de vitaminas, minerais e aromas. Cada farinha é produzida com uma Pré-Mistura específica, cujas concentrações dos seus componentes, apesar de próximas, são únicas. Assim, tendo em conta o número de farinhas lácteas e não lácteas produzidas na fábrica, existem catorze pré-misturas. Estas pré-misturas são constituídas por carbonato de cálcio seco, ferro (na forma de fumarato de ferro ou pirofosfato de ferro), *vitamin premix*, o qual consta numa mistura de vitaminas e/ou minerais já homogeneizada pelo fornecedor, aroma de vanilina e outros aromas característicos do produto. Estes componentes são todos pesados pelos operadores de linha e misturados num misturador industrial em condições ótimas de tempo e velocidade para a obtenção de uma mistura homogénea, apenas com uma margem de erro máxima de 15%, em termos de homogeneidade. De acordo com a receita dos produtos, as concentrações de cálcio, ferro e vitamina C nestas pré-misturas podem variar aproximadamente entre 11-30 g/100 g, 1,0- 2,3 g/100 g e 5,9-16,3 g/100 g, respetivamente.

1.6. Objetivos

O objetivo geral do presente trabalho centra-se no estudo de métodos alternativos de análise à Espectrofotometria de Absorção Atômica e à Titulação Potenciométrica para quantificação do teor de cálcio, ferro e vitamina C em pré-misturas enriquecidas em micronutrientes. Os objetivos específicos são:

- desenvolvimento de nove modelos matemáticos que estudam a relação entre a quantificação de cálcio e ferro em pré-misturas de micronutrientes por Espectrofotometria de Absorção Atômica e por Espectroscopia de Fluorescência por Raios-X;
- desenvolvimento de nove modelos matemáticos que estudam a relação entre a quantificação de vitamina C em pré-misturas de micronutrientes por Titulação Potenciométrica e por Espectroscopia de Infravermelho Próximo com Transformada de *Fourier*;
- estudo do efeito da matriz na análise de cálcio e ferro por Espectroscopia de Fluorescência por Raios-X e de vitamina C por Espectroscopia de Infravermelho Próximo com Transformada de *Fourier*.

2. Estado da Arte

2.1. Métodos de Análise de Referência

A metodologia analítica de referência utilizada pela Nestlé para a quantificação de cálcio e ferro é a Espectrofotometria de Absorção Atômica por Chama e para a quantificação de vitamina C é a Titulação Potenciométrica. Os dois próximos subcapítulos resumem os princípios de funcionamento de cada método, os componentes necessários e a respetiva função.

2.1.1. Espectrofotometria de Absorção Atômica (EAA)

A EAA é uma das técnicas analíticas mais usadas para efetuar análises elementares, de elementos metálicos e metalóides, a baixas concentrações, sendo o limite de deteção da técnica na ordem dos 1-1000 ng/mL (Kellner *et al.*, 1998). Segundo Skoog *et al.* (2004), o limite de deteção para cálcio e ferro por EAA por chama é 1 ng/mL e 6 ng/mL, respetivamente. Esta técnica baseia-se na medição da absorção de energia por parte dos átomos. A EAA tem várias variantes, de acordo com o processo de atomização em causa: EAA por chama, EAA eletrotérmica (em forno de grafite), EAA com geração de hidretos e EAA com vapor frio (Skoog *et al.*, 2004).

A EAA estudada neste trabalho é a EAA por chama. Nesta técnica, a amostra em solução, é aspirada como um aerossol para a chama e é convertida em vapor atômico (Skoog *et al.*, 2004). Os átomos produzidos com a luz incidente, com um comprimento de onda específico proveniente da lâmpada específica do elemento a medir, são elevados para um estado excitado e absorvem energia (Perkin Elmer, 2011; Skoog *et al.*, 2004). A análise por absorção atômica depende da existência de vários componentes, os quais:

- Fonte de radiação

A fonte de radiação emite o espectro do elemento a analisar. As lâmpadas normalmente utilizadas são de cátodo oco (HCL), de descarga sem elétrodos ou, ainda, de descarga de vapor (Perkin Elmer, 2011; Skoog *et al.*, 2004). As lâmpadas utilizadas podem ser de um único elemento ou combinadas, para analisar mais do que um elemento (Perkin Elmer, 2011; Skoog *et al.*, 2004). No caso do cálcio e do ferro, as lâmpadas usadas são de um único elemento.

- Modulador

Para além da radiação emitida pela lâmpada, a chama também emite radiação eletromagnética com o mesmo comprimento de onda a analisar. Contudo, não interessa que esta radiação, vinda da chama, atinja o detetor e seja medida como se fosse radiação proveniente da lâmpada. Para isto, recorre-se à modulação da fonte de radiação de interesse que pode ser feita por uma interrupção do feixe, que faz com que a radiação proveniente da lâmpada atinja o detetor na forma de um sinal modulado (intermitente) sendo, assim, possível o detetor reconhecer o sinal proveniente da lâmpada (Skoog *et al.*, 2004; Metcalfe, 1987).

- Sistema de Atomização

O sistema de atomização tem como função a produção de átomos gasosos, os quais irão absorver a radiação eletromagnética proveniente da lâmpada. Este sistema é constituído por vários componentes: o nebulizador, a câmara de nebulização e o queimador (Perkin Elmer, 2011; Skoog *et al.*, 2004). O nebulizador serve para aspirar a amostra e formar o aerossol. Na câmara de nebulização ocorre a mistura do aerossol com os gases, o oxidante (ar) e o combustível (acetileno). Nesta fase, de forma a conseguir-se a máxima sensibilidade, o queimador é alinhado de modo a que o feixe de luz passe através da chama, para que a radiação seja absorvida (Perkin Elmer, 2011). A temperatura da chama varia consoante a proporção de gases que a constituem, contudo normalmente neste tipo de chama (em que o gás redutor é o acetileno e o oxidante é o ar) o intervalo de temperatura varia entre 2100 °C a 2400 °C (Metcalf, 1987).

- Monocromador

O monocromador tem como função isolar a radiação eletromagnética específica do elemento a analisar. É constituído por uma grade de difração que provoca a dispersão da radiação nos comprimentos de onda que a compõem, através de fendas (Skoog *et al.*, 2004). Este componente deve permitir a passagem do máximo de energia proveniente da radiação específica do elemento em análise, para que o limite de detecção possa ser o mais baixo possível (Metcalf, 1987).

- Detetor e Amplificador

A radiação incidente no detetor é detetada por fotomultiplicadores e é convertida num sinal elétrico mensurável.

A figura 1 esquematiza o processo de EAA, evidenciando os componentes envolvidos na análise. A radiação proveniente da lâmpada de cátodo oco (HCL) é dirigida para o atomizador/sistema de atomização. Os feixes de luz entram, depois, no monocromador e a radiação isolada é detetada pelo detetor de fotomultiplicadores (PMT) e amplificada e processada no processador de sinal e, por fim, direcionada para o computador.

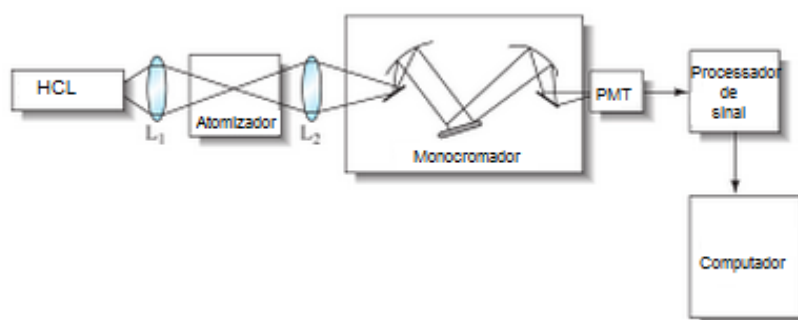


Figura 1 – Esquema representativo da análise por Espectrofotometria de Absorção Atômica por chama (adaptado de Skoog *et al.*, 2004).

2.1.2. Doseamento de Ácido ascórbico por Titulação Potenciométrica

O ácido L-ascórbico é a forma biologicamente mais ativa da vitamina C. Apesar de haver mais quatro pares enantioméricos, apenas o ácido L-ascórbico está presente na natureza (Anónimo, 2009).

A titulação consiste num método de análise volumétrica para determinação da concentração de uma solução mediante a utilização de uma solução padrão de concentração rigorosamente conhecida. De acordo com a documentação interna da Nestlé, neste método a vitamina C é extraída, por ação do ácido metafosfórico, sob condições ácidas de forma a evitar a auto-oxidação do ácido ascórbico (Anónimo, 2009). Nesta reação ocorre a redução estequiométrica do corante 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP), um agente oxidante suave, da sua forma azul-púrpura na sua forma incolor. A figura a seguir apresentada esquematiza a reação descrita.

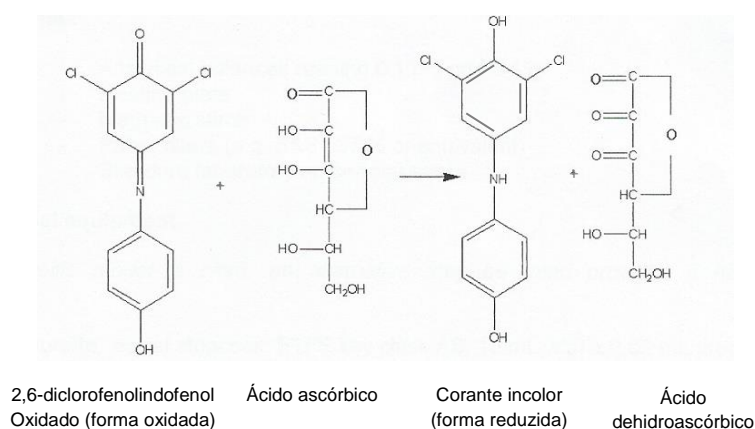


Figura 2 – Reação entre o ácido ascórbico e o corante 2,6 - diclorofenolindofenol na sua forma oxidada, com formação de corante incolor na sua forma reduzida e de ácido dehidroascórbico (adaptado de Anónimo, 2009).

Este método parece ser o mais satisfatório devido à presença de substâncias redutoras que não interferem com as reações relacionadas com determinadas concentrações de hidrogénio. Contudo, este método tem algumas desvantagens inerentes à sua natureza calorimétrica (GÁL, 1936).

2.2. Métodos Alternativos de Análise

Nos dias de hoje os equipamentos de análise são cada vez mais sofisticados, com maior precisão e fiabilidade. Numa única amostra podem ser medidas quantidades consideráveis de variáveis (Ferreira *et al.* 1999).

Como referido anteriormente, para a quantificação de minerais como o cálcio e o ferro a metodologia alternativa usada na Nestlé é a Espectroscopia de XRF e para a quantificação da vitamina C é a Espectroscopia de NIR, sendo cada um dos aparelhos utilizados nesta quantificação denominados pela sigla do método.

Nestas técnicas de espectroscopia, a intensidade de absorção na elevada gama de comprimentos de onda analisada é registada num único espectro. Assim, dada a grande quantidade de dados obtida é necessário trabalhar com ferramentas capazes de extrair a informação fundamental. A ferramenta cada vez mais usada para este fim é a Quimiometria, a qual pode ser definida como uma disciplina química que aplica métodos matemáticos e estatísticos para delinear procedimentos experimentais de forma otimizada e para obter a máxima informação química relevante dos dados obtidos (Ferreira *et al.* 1999). Estes dados obtidos são de grande complexidade, uma vez que há várias espécies presentes na mesma amostra. Para a análise deste tipo de dados os métodos multivariados são os mais adequados (GÁL, 1936). As calibrações univariadas têm algumas desvantagens na sua aplicabilidade neste tipo de análises, entre as quais: as perturbações ou *outliers* causados por componentes desconhecidos não são reconhecidos porque a concentração do analito é determinada apenas num único ponto espectral; as flutuações estatísticas provocadas pelas interferências no detetor são diretamente refletidas nas concentrações obtidas, entre outras (Anónimo, 2006). As calibrações multivariadas consideram as características espectrais numa ampla gama, não tendo apenas em conta um único ponto espectral. Desta forma, a análise das bandas sobrepostas e dos picos largos torna-se viável (Anónimo, 2006).

Nos dois capítulos seguintes serão descritos os princípios de funcionamento dos dois métodos alternativos de análise, bem como a análise estatística por detrás de cada um que permite a obtenção dos modelos de calibração.

2.2.1. Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X

Os raios-X são ondas eletromagnéticas com um determinado comprimento de onda que traduzem feixes de fótons com uma determinada energia (Skoog *et al.*, 2004). No espectro eletromagnético, estes raios encontram-se entre os raios-gama (γ -rays) e os raios ultravioleta (*Ultraviolet*), sendo o seu comprimento de onda compreendido entre 0,01 e 10,0 nanómetros (nm), correspondendo a uma energia de 0,125 e 125 quilo-eletrão volt (keV). A figura abaixo mostra esta gama do espectro eletromagnético onde se inserem os raios-x.

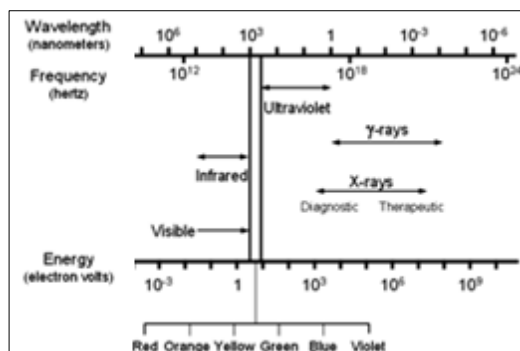


Figura 3 – Localização dos raios-x (*X-rays*) no espectro eletromagnético, apresentado como uma função do comprimento de onda, em nanómetros, da frequência, em hertz, e da energia, em eletrão volts. (adaptado de Seibert, 2004).

De uma maneira geral, numa análise por XRF, uma amostra é irradiada por uma fonte de raios-x que tem como função ionizar, por efeito fotoelétrico, os níveis internos dos átomos constituintes da amostra (Kellner *et al.*, 1998). Após a ionização, ocorre a reorganização do átomo, na qual há libertação do excesso de energia, resultante da diferença de energia de ligação dos níveis entre os quais se deu a transição (Kellner *et al.*, 1998). O que efetivamente acontece pode ser resumido em três fases (Kellner *et al.*, 1998) e está ilustrado na figura 4:

1) Um fóton, proveniente da fonte de raio-x, é totalmente absorvido por um dos átomos da amostra e ocorre a libertação de um elétron. Parte desta energia serve precisamente para provocar esta libertação do elétron (uma vez que a energia incidente é superior à energia de ligação do elétron do átomo) e outra parte é transferida para o elétron como energia cinética;

2) A libertação do elétron provoca uma alteração da configuração da orbital, ficando um espaço livre na orbital, deixando o átomo num estado extremamente excitado e instável;

3) Para repor o equilíbrio, ou seja para readquirir a configuração eletrônica mais estável, ocorre a transferência de um elétron de uma orbital de maior energia para o espaço deixado. O excesso de energia é libertado sob a forma de radiação de raios-x fluorescente.

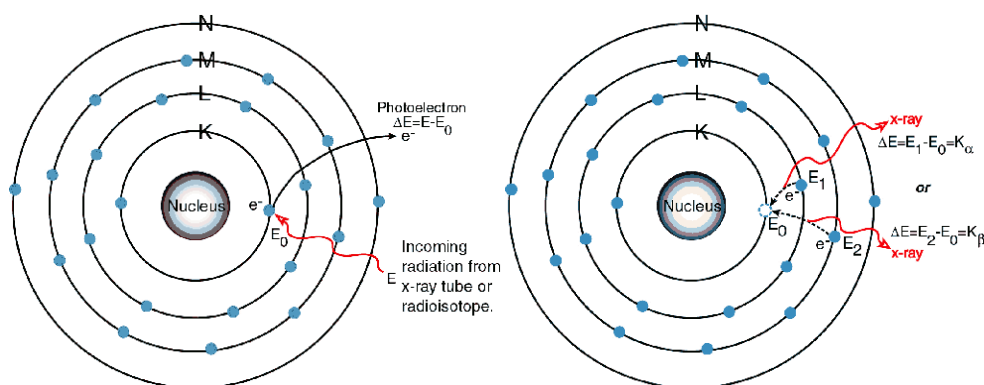


Figura 4 – Ionização e reorganização atômica por transição radioativa (Buckman-Ellis, 2004).

Uma vez que o raio-x emitido é específico de cada elemento, a detecção e análise do espectro obtido permite a identificação e a quantificação de cada um dos elementos constituintes da amostra.

Geralmente, as orbitais mais relacionadas com os raios-x são as K e L (Buckman-Ellis, 2004). Os raios-x produzidos pelas transições dos níveis $n=2$ para $n=1$ são designadas por raios-x K-alfa ($K\alpha$) e os que transitam do nível $n=3$ para $n=1$ são chamados de raios-x K-beta ($K\beta$). As transições para o nível $n=2$, são designadas por raios-x $L\alpha$ e $L\beta$, consoante a transição for do nível $n=3$ ou $n=4$ respetivamente (Buckman-Ellis, 2004; Nave, 2000).

Existem vários métodos de espectroscopia de XRF, entre os quais se podem destacar a Fluorescência de raios-x por dispersão de energia (EDXRF) e a Fluorescência de raio-x por comprimento de onda dispersivo (WDXRF). A metodologia estudada neste trabalho é a primeira, a qual é relativamente simples e com baixos custos associados, quando comparada com outras técnicas (Nave, 2000). Para esta técnica são necessários vários componentes:

- Fonte de raios-x

É um tubo de raios-x com voltagem variável e com uma potência entre 50 a 300 Watts (W) (Nave, 2000). Como se pode observar pela figura 5, este tubo é constituído por um filamento (*filament*) e por um ânodo (*anode*) inseridos numa câmara em vácuo (Brouwer, 2013). A corrente elétrica atinge o filamento e os eletrões (*electrons*), acelerados pela alta voltagem (*high voltage*), são emitidos e seguem em direção ao ânodo (Brouwer, 2013). Quando esses eletrões atingem o ânodo sofrem uma desaceleração e causam a emissão dos raios-x, os quais deixam o tubo passando através de uma janela de Berílio (*Be window*) (Brouwer, 2013).

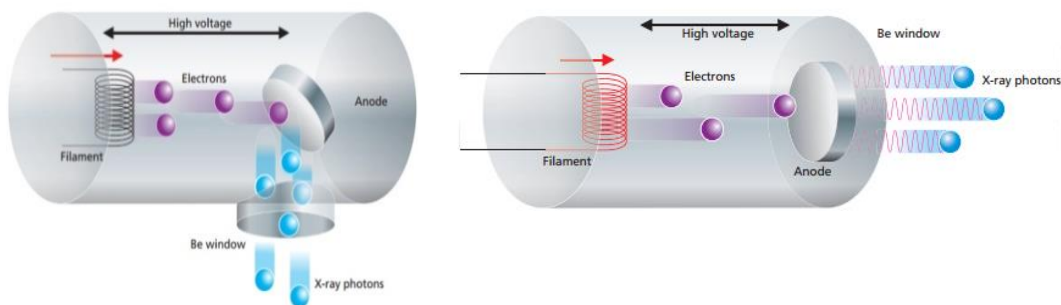


Figura 5 – Designs possíveis de um tubo de raio-x (Brouwer, 2013).

Há, essencialmente, duas configurações distintas de análise de amostras no XRF, a três dimensões (3D) e a duas dimensões (2D) (Brouwer, 2013). Na configuração mais simples, e também a utilizada na fábrica de Avanca, o tubo de raio-x irradia diretamente a amostra, e a fluorescência proveniente da amostra é medida no detetor de energia dispersiva.

- Filtro

Os filtros são colocados entre a fonte de raios-x e a amostra e têm o objetivo de diminuir as interferências e o *background* (normalmente definido como ruído de fundo, consistindo nas radiações dispersas que atingem o detetor) e, conseqüentemente, melhorar a relação sinal-ruído (Brouwer, 2013). Os filtros normalmente são de alumínio ou de bronze e têm uma espessura variável entre 100 e 1000 micrómetros (μm), dependendo do que se quer filtrar, contudo há cinco tipos de filtros diferentes (Brouwer, 2013; Anónimo, 2005).

- Cristal de difração e Colimador

Os cristais de difração, uma pilha de camadas com igual espessura, são usados para separar a radiação característica proveniente da amostra nos diferentes comprimentos de onda de acordo com a lei de Bragg (Brouwer, 2013). O colimador é um componente que assegura que a radiação proveniente da amostra atinja o cristal.

- Detetor

O detetor é o componente que permite interpretar os sinais que são emitidos e difundidos da amostra. O detetor do aparelho utilizado é um detetor de estado sólido, os quais podem ser constituídos por silicone, germânio ou outro material semiconductor (Brouwer, 2013). A estrutura deste tipo de detetores está ilustrada na figura 6, na qual se pode ver a janela de Berílio (*Be window*), antecedida por um prato coletor e seguida por uma camada (*dead layer*), através da qual passam os

fotões (*photons*). Quando estes fotões de raios-x atingem o detetor, é produzido um pulso elétrico, cuja altura é proporcional à energia do fotão. Estes pulsos gerados são amplificados e contados por um analisador multicanal (MCA). O número de eletrões depende da energia dos fotões, pelo que quanto maior a energia maior o número de eletrões produzidos.

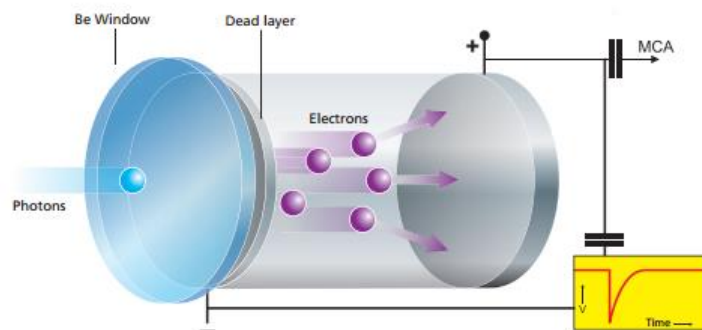


Figura 6 – *Design* básico de um detetor de estado sólido (Brouwer, 2013).

O analisador multicanal conta, em contagens por segundo (cps), os pulsos que são gerados por cada pico, os quais traduzem a intensidade dos feixes. A altura do pico é tanto maior quanto maior for a concentração desse elemento na amostra (Brouwer, 2013). O detetor e o MCA têm a capacidade de distinguir diferentes energias, fenómeno denominado por resolução. Neste tipo de espectrómetros, estes componentes têm a capacidade de distinguir entre 1000 a 16000 níveis de energia diferentes (Brouwer, 2013). Para se detetar um pico de um elemento, este deve estar significativamente acima do ruído de fundo, o qual depende das contagens efetuadas. Quanto menos contagens forem feitas maior será o efeito do ruído de fundo (Brouwer, 2013).

- Máscaras

As máscaras são pratos com um orifício no centro. Quando a fonte de raios-x emite radiação, esta atinge a amostra mas parte dela também atinge o suporte da amostra. Este suporte, irradiado, irá emitir radiação característica, a qual também poderá atingir o detetor e provocar um aumento da interferência. Para evitar que isto aconteça, coloca-se a máscara entre a amostra e o detetor, para que este apenas seja atingido com radiação de interesse (Brouwer, 2013).

- *Spinner*

As amostras nem sempre são homogéneas e qualquer defeito na sua superfície, como arranhões, fissuras ou quebras, podem interferir nas medições. Assim, este componente provoca a rotação da amostra durante a análise com o intuito de fazer com que a não homogeneidade da amostra interfira no resultado (Brouwer, 2013).

- Gás usado na medição

A medição pode ser feita num ambiente com gases como o ar ou o hélio, bem como em vácuo. Normalmente a análise é feita com ar, contudo o hélio pode ser usado para analisar elementos com baixo peso molecular (Brouwer, 2013).

O esquema apresentado na figura 7 pretende evidenciar todo o processo de análise de uma amostra no aparelho XRF, de uma forma muito simples e sucinta.

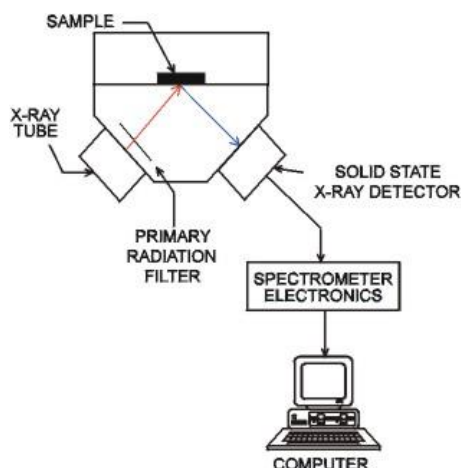


Figura 7 – Esquema representativo do funcionamento do aparelho XRF (Thermo Scientific, n.d.).

Todas as condições de operação devem ser ajustadas e adequadas aos elementos a medir, de forma a otimizar a análise, objetivando uma diferença mínima entre o resultado previsto pelo aparelho e o resultado obtido pelo método analítico de referência.

Este equipamento tem o programa *MINIPAL & MINIMATE*, que possibilita a comparação de espectros e a recalibração.

No EDXRF o espectro é medido simultaneamente em toda a gama e a área dos picos determina a concentração de um elemento. A medição da altura do pico é uma alternativa, contudo, apenas esta análise traria alguma perda de informação uma vez que a área do pico é menos sensível ao ruído do que a altura do mesmo pico (Brouwer, 2013). Este equipamento usa uma técnica matemática para encontrar os picos num determinado espectro e de forma a conseguir identificá-los, compara-os com uma base de dados existente (Brouwer, 2013). Para se determinar a área dos perfis individuais usa-se um processo baseado num algoritmo usado para reverter os efeitos de convolução, denominado em inglês por *deconvolution* (Brouwer, 2013). Esta técnica faz com que o espectro obtido se aproxime ao máximo dos espectros teóricos. A área destes perfis é alterada, mas mantém a estrutura original, de forma a que a soma de todos os perfis se ajuste o melhor possível ao espectro medido (Brouwer, 2013). Assim, de forma a encontrar o ajuste ideal para o conjunto de dados, de acordo com o método dos mínimos quadrados, encontra-se a reta que minimiza a soma dos erros quadráticos (SEQ) (Cabral e Sarsfield, 1997). Esta soma é dada pela expressão (Cabral e Sarsfield, 1997):

$$SEQ = \sum_{n=1}^N e_n^2 = \sum_{n=1}^N (y_n - a - b \times x_n)^2$$

e_n – erro associado a cada ponto, medido na direção do eixo yy

(x_n, y_n) – dados

a – ordenada na origem

b – declive

Quando se está a fazer este ajuste é importante ter em conta o *background*, pelo que este deve ser subtraído à intensidade da energia medida, resultando desta diferença a intensidade líquida (Brouwer, 2013). Na análise quantitativa, as intensidades líquidas são convertidas para concentrações. Para que isto aconteça, o procedimento usual é a calibração do espectrómetro analisando materiais de referência (Brouwer, 2013). A calibração determina a relação entre a concentração dos elementos e a intensidade de fluorescência desses elementos. Idealmente, a intensidade é proporcional, de uma forma linear, à concentração do analito e, ao longo de uma gama limitada é isto que acontece. Assim, dentro de uma determinada gama, a curva de calibração descreve esta relação através do modelo matemático: $C=D + E \times R$, em que E e D são determinados pela regressão linear. Contudo, a matriz do produto tem uma influência importante na linearidade desta relação, sendo que é necessário criar modelos de correção da matriz, os quais acrescentam ao modelo anterior um fator de correção, resultando na seguinte equação: $C_i=D_i + E_i \times R_i \times [1 + \text{correções}]$, em que i corresponde à intensidade do sinal (Anónimo, 2005; Brouwer, 2013).

2.2.2. Espectroscopia de Infravermelho Próximo (NIR)

A radiação Infravermelha (IV), no espectro eletromagnético, localiza-se entre a radiação visível e as micro-ondas, sendo o seu comprimento de onda variável entre 700 nm e 1000 nm, correspondente a uma energia de 300 Gigahertz (GHz) a 430 Terahertz (THz) (Griffiths e Haseth, 2007). Os raios-IV estão divididos, essencialmente, em duas categorias: NIR (Infravermelho Próximo) com 0,78 a 2,5 μm e MWIR (Infravermelho de Comprimento de Onda Médio) com 2,5 a 50 μm , contudo este último grupo pode ser subdividido de acordo com alguns autores (Skoog *et al.*, 2004)

Na espectroscopia de NIR, as moléculas constituintes da amostra absorvem a radiação incidente e ocorre a passagem do estado fundamental para um estado excitado, havendo absorção de energia correspondente à diferença de dois níveis energéticos vibracionais. Desta forma, as absorções ocorrem a um determinado comprimento de onda, que corresponde à energia que permite a transição (Skoog *et al.*, 2004). A espectroscopia de NIR compreende análises qualitativas e análises quantitativas (Skoog *et al.*, 2004). Na análise qualitativa é necessário haver uma biblioteca de espectros a qual permite a identificação de substâncias puras e/ou a confirmação de misturas pré-definidas. Na análise quantitativa são utilizados modelos de calibração multivariada (Anónimo, 2006). Na espectroscopia de NIR são gerados espectros complexos, que apresentam sobreposições e combinações das ligações CH, OH e NH dos grupos funcionais. A figura 8 apresenta as principais sobreposições e combinações existentes.

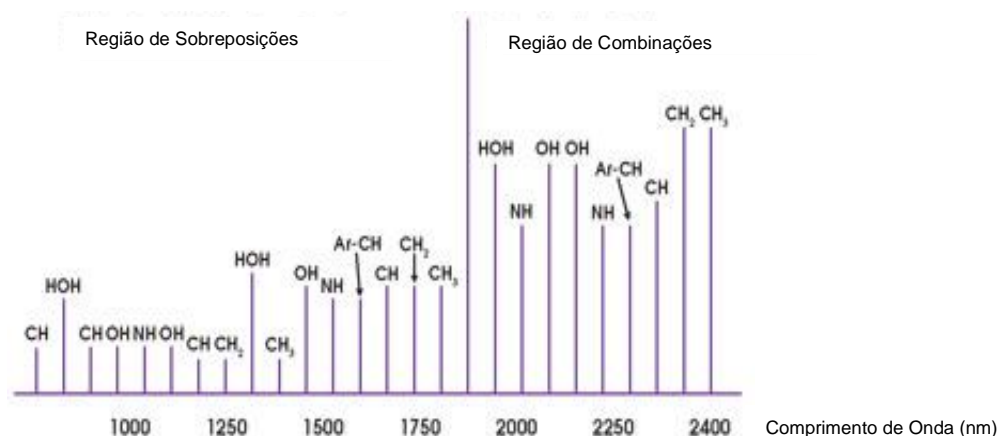


Figura 8 – Sobreposições e Combinações de ligações características da espectroscopia de NIR (adaptado de Bergles e Yang, 2009)

Neste tipo de espectroscopia é necessário recorrer a métodos estatísticos e realizar uma calibração multivariada, em que há a produção de um modelo matemático no qual múltiplas respostas (isto é múltiplos comprimentos de onda) são relacionadas com uma ou mais propriedades desconhecidas (isto é concentrações de um determinado analito) (Pimentel *et al.*, 2008).

Para se proceder à análise por espectroscopia de NIR são necessários os seguintes componentes:

- Fonte de radiação

A fonte de luz mais usada é a lâmpada de halogéneo com filamento de tungsténio (Bakeev, 2005). Para este tipo de análise, a nível industrial, em que há necessidade de o aparelho estar ligado em contínuo, o tempo de vida requerida para estas lâmpadas ronda os doze meses (Bakeev, 2005).

- Interferómetro

O interferómetro é um aparelho que mede comprimentos de onda permitindo o estudo de interferências. O interferómetro de Michelson é o tipo de interferómetro de dois feixes mais conhecido. O seu mecanismo consiste na divisão do feixe de radiação, proveniente da fonte de luz, em dois feixes perpendiculares (Griffiths e Haseth, 2007). Esta divisão é feita por um espelho semitransparente que reflete parte da luz e deixa passar outra parte. Os dois feixes são refletidos por dois espelhos, que provocam o regresso dos mesmos ao espelho e estes misturam-se novamente para produzir um padrão de interferência (Griffiths e Haseth, 2007). A análise deste padrão de interferência permite observar pequenas variações no tempo que os feixes demoram a percorrer o seu percurso, as quais provocam deslocamentos do padrão de interferência (Griffiths e Haseth, 2007). Contudo, a forma como este interferograma apresenta a informação não é muito útil, pelo que tem que ser transformada, através da transformada de Fourier, num espetro, no qual se relacionam as intensidades com as respetivas frequências (Perkins, 1986).

- Detetor

Existem vários detetores, mediante a gama de comprimentos de onda de interesse. Os detetores de silício são indicados para comprimentos de onda baixos, enquanto os detetores de

comprimento de ondas maiores são os de sulfureto de chumbo (PbS) e índio-gálio-arsénio (InGaAs) (Griffiths e Haseth, 2007).

- Compartimento para amostras, Esfera de integração e sondas de fibra ótica unidade de transmissão

Este equipamento tem um compartimento para colocar as amostras, com possibilidade de aquecer a amostra e de fazer *background* automático, que permite a fácil análise de amostras líquidas em cuvetes ou frascos descartáveis (Anónimo, 2013). A esfera de integração possibilita a execução das medições de uma forma rápida e fácil, utilizando a técnica de refletância difusa (Anónimo, 2013). As amostras podem ser medidas em copos padrão, nomeadamente em copo de quartzo ou em frascos de vidro com diâmetro de 22 milímetros (mm). A rotação da amostra no suporte giratório assegura uma elevada reprodutibilidade para amostras heterogêneas (Anónimo, 2013). As leituras das sondas de fibra ótica, em transmitância ou em refletância, podem ser feitas no local da própria produção do produto a analisar, isto é *on-line* (Anónimo, 2013).

O método de análise utilizado no trabalho desenvolvido é a refletância difusa, processo esquematizado na figura 9. Assim, como se pode observar nesta figura, a fonte de radiação (201) emite um feixe luminoso (211) que é direcionado para a esfera de integração (209), sendo refletido para a amostra (203) (Herron *et al.*, 2013). Quando a radiação entra em contacto com a amostra, uma parte é absorvida pelas ligações vibracionais e a fração que não é absorvida pode ser refletida de volta (Herron *et al.*, 2013). A energia refletida, em todas as direções, é captada pela esfera e novamente refletida para o detetor (205). O detetor recolhe a radiação que foi refletida de forma difusa, mediante o cálculo do quociente entre a intensidade da luz refletida e a intensidade da luz incidente (Herron *et al.*, 2013). Cada vibração molecular corresponde a uma banda de absorvância específica e, assim, os componentes constituintes da amostra podem ser identificados pela análise do espectro obtido (Herron *et al.*, 2013).

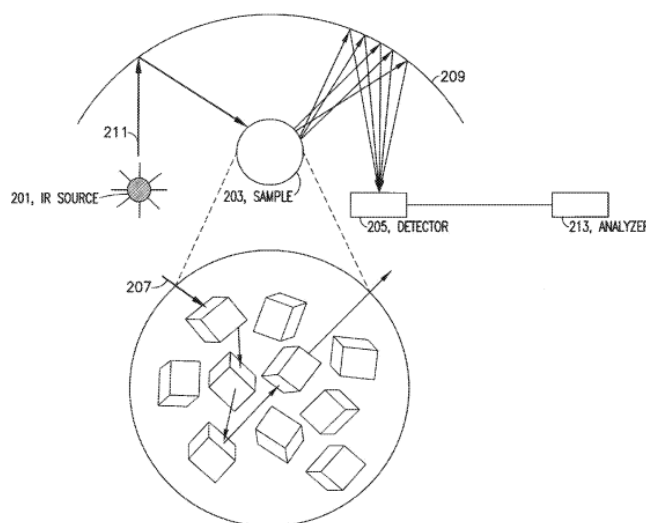


Figura 9 – Esquema representativo da Espectroscopia por Refletância Difusa no Infravermelho com Transformada de *Fourier* (Herron *et al.*, 2013).

Este equipamento tem o programa *OPUS/QUANT*, doravante denominado por *QUANT*, o qual baseia a sua análise numa calibração multivariada. No estudo de análises multivariadas para a qualificação e quantificação em NIR existem vários algoritmos, dos quais se destacam a análise de componentes principais, a análise de Clusters, a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), a regressão múltipla linear, entre outros (Anónimo, 2006).

O *QUANT* é desenhado para efetuar uma análise quantitativa de espetros com uma considerável sobreposição de bandas, como acontece na gama de NIR, como referido anteriormente. Estes espetros são normalmente originados a partir de amostras com vários componentes na matriz (Anónimo, 2006). Assim, o *QUANT* determina, simultaneamente, a concentração de mais que um componente em cada amostra, usando para este fim o método de ajuste PLS (Anónimo, 2006). Os componentes podem ser analisados cada um em separado (PLS-1) ou em simultâneo (PLS-2), contudo o *QUANT* apenas utiliza o algoritmo PLS-1.

Nas análises estatísticas utilizadas quer na análise por XRF e NIR, há alguns fatores que espelham a adequação do modelo, nomeadamente:

- o resíduo, que é a diferença entre o valor verdadeiro e o valor ajustado, sendo a soma do quadrado dos erros (SSE, equivalente à SEQ) a soma quadrática destes valores (Cabral e Sarsfield, 1997);

- a estimação do erro quadrático médio (RMSEE), que é calculado a partir da soma anterior pela seguinte expressão: $RMSEE = \sqrt{\frac{1}{M-R-1}SSE}$, onde M é o número de amostras e R o *rank* (Anónimo, 2006);

- o coeficiente de determinação, r^2 , que traduz a percentagem da variabilidade que é explicada pelo modelo, que quanto mais próximo de 1 melhor o rigor global do ajuste do modelo (Cabral e Sarsfield, 1997);

- o coeficiente de correlação, R^2 , que traduz a relação existente entre as duas variáveis em estudo. Quanto mais próximo da unidade for o seu módulo, melhor será a relação existente (Cabral e Sarsfield, 1997).

Estes factores foram considerados na elaboração do trabalho experimental que se apresenta nos capítulos seguintes.

3. Materiais e Métodos

3.1. Tipologia e concepção das amostras objecto de estudo

Para a construção das curvas de calibração para os três parâmetros a analisar, utilizaram-se amostras já previamente preparadas na linha de produção e amostras experimentais, as quais foram preparadas em laboratório. A elaboração das amostras experimentais decorreu da necessidade de aumentar a gama de concentrações de forma a, por um lado, melhorar a linearidade da curva e, por outro lado, ser possível detetar e quantificar possíveis erros na elaboração da pré-mistura na linha de produção. Assim, fez-se um planeamento para elaboração destas amostras, no qual se calcularam as quantidades de cada componente da pré-mistura para obtenção de amostras com cálcio, ferro e vitamina C concentrados e diluídos em, aproximadamente, 15% e 30%.

Analisaram-se nove pré-misturas, duas das quais são constituintes de farinhas não lácteas e sete fazem parte da formulação de farinhas lácteas, como se pode observar pela tabela 1. De uma forma geral, as pré-misturas estudadas podem ser divididas em quatro grupos. O cálcio está presente em todas sob a forma de carbonato de cálcio e é adicionado individualmente. A vitamina C está presente sob a forma de ácido ascórbico numa matriz com outras vitaminas, sendo adicionada incorporada num *vitamin premix*. Existem três *vitamin premix* diferentes (A, B e C). O ferro pode também ser incorporado em dois destes *vitamin premix*, na forma de fumarato de ferro. Contudo, é, também, adicionado individualmente nesta mesma forma ou numa matriz de vitaminas e minerais denominada de *Trace Elements* sob a forma de pirofosfato de ferro. Assim, as pré-misturas podem ser divididas em grupos consoante a combinação das formas de adição do ferro e da vitamina C. As pré-misturas usadas nas farinhas lácteas Simples, com Pera, com Maçã ou com Tâmaras têm na sua constituição o mesmo *vitamin premix* (*vitamin premix A*) e o ferro é adicionado, individualmente, como fumarato de ferro. Este grupo foi definido como Grupo 1a. As pré-misturas utilizadas nas farinhas lácteas com Multifrutos, Banana e com Frutos são constituídas pelo *vitamin premix A*, mas, nestes casos, o ferro é adicionado sob a forma de pirofosfato de ferro na matriz do *Trace Elements*. Este grupo foi definido como Grupo 1b. A pré-mistura usada nas farinhas não lácteas Multifrutos tem o ferro, sob a forma de fumarato de ferro, e a vitamina C incorporados no mesmo *vitamin premix*, (*vitamin premix B*). Este grupo foi definido como Grupo 2. A pré-mistura constituinte das farinhas não lácteas Simples são compostas por um *vitamin premix* (*vitamin premix C*) que incorpora vitamina C e ferro, na forma de fumarato de ferro. Finalmente, este grupo foi definido como Grupo 3. A tabela 1 apresenta a divisão das pré-misturas explicada acima.

Tabela 1 – Grupos de Pré-Misturas divididos consoante o *Vitamin Premix* e a fonte de ferro usados.

	Pré-Mistura de acordo com Farinha correspondente		Fonte de Ferro	Vitamin Premix (VP)
Grupo 1a	Farinhas Lácteas	Simplex	Fumarato de Ferro	VP A
		Pera		
		Maçã		
		Tâmaras		
Grupo 1b	Farinhas Lácteas	Multifrutos	Trace Elements (Pirofosfato de Ferro)	
		Banana		
		Frutos		
Grupo 2	Farinhas não Lácteas	Multifrutos	Fumarato de Ferro	VP B
Grupo 3		Simplex	Fumarato de Ferro	VP C

O número de amostras utilizadas em cada pré-mistura para a construção da curva de calibração de cada elemento foi, aproximadamente, de trinta e três amostras, sendo vinte e cinco retiradas da linha de produção e oito elaboradas em laboratório. Inicialmente analisaram-se em duplicado (de uma amostra efetuaram-se duas pesagens originando dois duplicados os quais foram analisados uma vez cada) todas as amostras, pelo método de análise de referência. Desta análise resultaram dois valores, correspondentes a cada uma das leituras, dos quais se calculou a média aritmética. Posteriormente, dois duplicados de cada amostra foram analisados pelo método de análise alternativo. Para que o programa de cada um dos equipamentos de análise alternativos efetuasse o estudo estatístico, foi necessário indicar o resultado de referência correspondente obtido anteriormente. Desta forma, a cada duplicado de uma dada amostra fez-se corresponder a média do resultado de referência dessa mesma amostra. Após analisadas as amostras, com os dois resultados alternativos obtidos fez-se a média aritmética e colocaram-se os pares de valores do conjunto amostral no programa estatístico *IMB SPSS Statistics 20.0*, doravante denominado por SPSS. Aplicando a regressão linear, desenvolveram-se os modelos matemáticos mais adequados aos dados e, posteriormente, fez-se um reajuste nas amostras selecionadas nos equipamentos de medição alternativa, de maneira a garantir que as amostras utilizadas na regressão linear pelo SPSS coincidiam com as amostras selecionadas nos equipamentos.

3.2. Amostras Experimentais

Para cada pré-mistura foram elaboradas pelo menos seis amostras com concentrações diferentes das produzidas na linha de produção. Assim, foram elaboradas duas amostras para cada concentração trabalhada, sendo que as concentrações abrangidas foram de 15% e 30% inferiores e superiores às concentrações da linha de produção, doravante denominadas de concentrações normais.

3.2.1. Planeamento da elaboração das amostras

Para se produzirem estas amostras teve-se por base a receita original do produto terminado. Nas amostras com os elementos diluídos, isto é na gama de 15% e 30% abaixo das concentrações

normais, diminuíram-se as quantidades dos elementos ativos (carbonato de cálcio, *Vitamin Premix* e Fumarato de Ferro/*Trace Elements*) em 15% e 30% e aumentaram-se as quantidades dos componentes inertes, os aromas.

Nas amostras com os elementos concentrados (aumento em 15 e 30%), sempre que foi possível, aumentaram-se em iguais proporções as quantidades dos compostos ativos e diminuíram-se os inertes. Contudo, muitas vezes não foi possível concentrar simultaneamente todos os componentes, isto é, numa só amostra, pelo que teve que se concentrar apenas um ou dois componentes de cada vez (portanto, elaborar mais do que uma amostra) e diminuir os restantes componentes usando um fator comum de multiplicação.

3.2.2. Preparação das amostras experimentais

Uma vez que não existe um procedimento implementado para a preparação destas amostras, foi necessário estudar as melhores condições de operação.

Para elaborar as amostras em laboratório foram necessários os compostos constituintes das pré-misturas, equipamentos e materiais, os quais estão resumidos na tabela 2, a seguir apresentada.

Tabela 2 – Compostos, material e equipamentos utilizados na elaboração das pré-misturas em laboratório.

Compostos das Pré-misturas	Material e Equipamentos
<ul style="list-style-type: none"> • Carbonato de Cálcio natural seco (CaCO_3, concentração 98 g/100 g) • Fumarato de Ferro ($\text{C}_4\text{H}_2\text{FeO}_4$, concentração 97 g/100 g) • <i>Trace Elements</i> • <i>Vitamin Premix</i> (A, B e C) • Aroma de Vanilina • Aroma de Maçã 	<ul style="list-style-type: none"> • Moinho Retsch Grindomix GM200 • Balança Mettler Toledo PG2002-S, Precisão 0,01 g • Máquina de soldar, AMPACK A.G. • Material: Colheres Metálicas; Saquetas metalizadas; Equipamento de Proteção Individual (EPI).

Uma vez que as quantidades de cada composto são diferentes consoante o produto e a amostra a preparar, faz-se uma descrição generalizada do procedimento utilizado para a preparação de 100,00 g de amostra experimental.

Após a calibração da balança, foram pesadas, para o interior do misturador metálico, as quantidades necessárias de carbonato de cálcio, aroma de vanilina, fumarato de ferro/trace elements (no caso das pré-misturas que têm estes compostos na sua constituição), e por último o *Vitamin Premix*. Após a pesagem de todos os componentes num total de 100 g de amostra, o misturador foi tapado com a tampa correspondente e a mistura foi misturada por dois períodos consecutivos de 30 segundos a 5000 rotações por minuto (rpm) em cada período. Depois de bem misturada, retirou-se o

conjunto do suporte, destapou-se o misturador e transferiu-se o conteúdo para uma saqueta metálica devidamente identificada. Por último, retirou-se o ar da saqueta e soldou-se a mesma termicamente.

3.3. Métodos de Análise de Referência

3.3.1. Procedimento de Espectrofotometria de Absorção Atômica para determinação de cálcio e ferro

Para a aplicação diária destes métodos, pelos analistas do laboratório Físico-Químico, foram elaboradas, pela Nestlé, instruções de trabalho, as quais descrevem detalhadamente todo o procedimento de análise. O procedimento descrito de seguida foi adaptado da instrução interna da Nestlé (Anónimo, 1999). Para efetuar a análise de cálcio e ferro utilizaram-se os reagentes, materiais e equipamentos enumerados na tabela 3.

Tabela 3 – Reagentes, material e equipamentos utilizados na Espectrofotometria de Absorção Atômica.

Reagentes	Material e Equipamentos
<ul style="list-style-type: none">• Óxido de Lantânio III, Ref. 112220• Ácido Nítrico Concentrado (65%), Ref. 100456• Solução Padrão de Cálcio 1000 mg/L, Ref. 119778• Solução Padrão de Ferro 1000 mg, Ref. 119781• Peróxido de hidrogénio (30%), Ref. 107209• Água ultrapura (18,2 MΩ.cm)	<ul style="list-style-type: none">• Balança Mettler Toledo AE200, Precisão 0,0001 g• Banho mgw LAUDA RM20• Aparelho de micro-ondas MLS-1200• Espectrofotómetro de Absorção Atômica AAnalyst 800• Material: balões de vidro, balões erlenmeyer, micropipetas, pipetas, pontas, cadinhos, colheres metálicas, funis de vidro, filtros de papel, chave de cruz, chave dinamométrica, EPI.

3.3.1.1. Preparação de Soluções

Para este método foi necessário proceder à preparação de algumas soluções.

Para preparar a solução de Lantânio 5% (m/v) começou-se por pesar 58,6 g de Óxido de Lantânio III e transferiu-se esta quantidade para um balão volumétrico de 1 L. De seguida, adicionaram-se 200 mL de água ultrapura e agitou-se lentamente o balão até homogeneização completa. Posteriormente, adicionaram-se cuidadosamente 250 mL de ácido nítrico 65% (v/v) e agitou-se o balão lentamente para dissolver. Por último, colocou-se o balão a arrefecer num banho a 20 °C, perfez-se o volume com água ultrapura e transferiu-se a solução para uma garrafa de polietileno.

Para a preparação das soluções mãe de Cálcio, 100 µg/mL, pipetaram-se 5 mL de uma solução padrão de Cálcio para um balão volumétrico de 50 mL e perfez-se o volume com água ultrapura. Por último, agitou-se o balão para homogeneização completa. Para a preparação da

solução mãe de Ferro, 100 µg/mL o procedimento foi exatamente o mesmo, tendo-se usado a solução padrão de Ferro em vez da solução padrão de Cálcio.

Para a preparação das soluções de calibração de Cálcio (0 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 3 µg/mL, 4 µg/mL e 5 µg/mL) pipetaram-se 5 mL da solução de Lantânio 5% (m/v) para seis balões volumétricos de 100 mL (1 a 6). Aos balões numerados de 2 a 6, adicionou-se, respectivamente, o seguinte volume de solução mãe de Cálcio: 1, 2, 3, 4 e 5 mL. Ao primeiro balão não se adicionou solução mãe de Cálcio. De seguida, perfez-se o volume com água ultrapura e agitou-se para homogeneização completa. Obtiveram-se seis soluções padrão com as seguintes concentrações de cálcio: 0, 1, 2, 3, 4 e 5 µg/mL. Para a preparação das soluções de calibração de Ferro (0 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 3 µg/mL, 4 µg/mL e 5 µg/mL) o procedimento foi o mesmo, contudo em vez de se pipetarem 5 mL da solução de Lantânio 5%, dosearam-se 10 mL da solução de Ácido Nítrico 65% (v/v) e em detrimento da solução mãe de cálcio utilizou-se a solução mãe de ferro, tendo-se obtido no final seis soluções com as concentrações de ferro de: 0, 1, 2, 3, 4 e 5 µg/mL.

3.3.1.2. Preparação de amostras para absorção atômica

Após preparadas as soluções necessárias à análise por EAA-chama, prepararam-se as amostras. De uma forma resumida, nesta preparação começou-se pela pesagem das amostras seguida da preparação das soluções para digestão das mesmas. Posteriormente decorreu a digestão ácida das amostras por micro-ondas. Após esta digestão, prepararam-se as soluções finais (em balões volumétricos com volume de 100 mL), construiu-se a curva de calibração para o elemento a analisar e, por último, procedeu-se à leitura das amostras por EAA-chama.

Com maior detalhe é a seguir descrito todo o procedimento.

Após a calibração da balança, pesaram-se, aproximadamente, 0,500 g de amostra para um vaso de Tetrafluormetaxil. Fez-se um duplicado de cada amostra usando dois vasos para cada uma. Na câmara de exaustão, adicionaram-se a cada um dos vasos 5 mL de ácido nítrico 65% (v/v) e 0,5 mL de peróxido de hidrogénio 30%. Posteriormente, colocaram-se os vasos no suporte correspondente e estes foram apertados, inicialmente, com a chave de cruz e, para o aperto final, com uma chave dinamométrica com uma pressão de 22,5 Nm, até se ouvir um clique. De seguida colocaram-se os suportes com os vasos no rotor do aparelho de micro-ondas MLS-1200 e procedeu-se à digestão ácida das amostras, durante 23 minutos. O programa usado está descrito na tabela 4.

Tabela 4 – Condições de operação usadas na digestão das amostras.

Etapas	Potência das Micro-ondas (W)	Temperatura (°C)	Tempo (minuto)
1	700	180	12
2	700	180	10
3	0	50	1

No final da digestão, retiraram-se os vasos do rotor do aparelho de micro-ondas e estes foram colocados em repouso, durante 30 minutos, na câmara de exaustão. Este passo foi importante para

evitar a libertação excessiva de pressão de dentro dos vasos, com a consequente projeção e perda de amostra. Após este período de espera, abriram-se, lentamente, os vasos com a chave de cruz e retiraram os vasos dos suportes. Com o auxílio de um funil de vidro, transferiu-se o conteúdo dos vasos para balões volumétricos de 50 mL e com um esguicho enxaguaram-se cuidadosamente as tampas e o interior dos vasos com água ultrapura, para os balões de 50 mL. Para evitar ao máximo a perda de amostra, enxaguou-se também o funil. Posteriormente, perfez-se o volume com água ultrapura e agitou-se a solução para homogeneização completa.

Para proceder à análise de cálcio e ferro foi necessário fazer uma diluição das amostras, para um volume final de 100 mL, considerando como volume inicial os 50 mL anteriormente preparados. O fator de diluição das amostras varia consoante a concentração dos componentes na solução. Para as amostras retiradas da linha de produção o fator usado para cálcio foi de 200 e para ferro de 1000, na maioria das análises. Para as amostras experimentais com menor concentração dos componentes este fator diminuiu, enquanto que nas amostras experimentais com uma concentração maior o fator usado foi mais elevado.

Para a análise de cálcio foi necessário adicionar, aos balões volumétricos de 100 mL, 5 mL de solução de Lantânio 5% (v/v) preparada anteriormente. Para a análise de ferro este passo não foi requerido. Após adicionar o volume de amostra necessário, aferiu-se o volume com água ultrapura.

3.3.1.3. Leitura de amostras no espectrofotómetro

O espectrofotómetro foi preparado para a leitura dos elementos, havendo pequenas diferenças nesta preparação consoante o elemento em questão. De um modo geral, os passos a efetuar incluíram a colocação da lâmpada de cátodo do elemento em questão (ferro ou cálcio) em posição, o ajustamento do comprimento de onda para os 248,3 nm (no caso do ferro) ou para os 422,7 nm (no caso do cálcio), a ligação do ruído de fundo (*Background*) e da lâmpada de Deutério do aparelho. Estes dois últimos passos foram efetuados apenas nas análises de ferro. Nas análises de cálcio o ruído de fundo foi desligado assim como a lâmpada de Deutério do aparelho, uma vez que não opera para comprimentos de onda superiores a 340 nm. Após 20 minutos o gás combustível (acetileno) e o gás comburente (ar) foram abertos e a chama do aparelho foi ligada e deixada a estabilizar durante 15 minutos.

Para a construção das curvas de calibração leram-se as soluções padrão do elemento a analisar preparadas anteriormente. Inicialmente, mergulhou-se o capilar de aspiração no balão do padrão 1 (0 µg/mL) do componente a analisar e fez-se “autozero” ao aparelho. De seguida mergulhou-se o capilar de aspiração em cada solução de calibração, começando pela solução de mais baixa concentração e registou-se o valor da absorvância fornecido pelo aparelho. O desvio padrão relativo foi controlado ao longo das análises, tendo-se por objetivo que este fosse o mais baixo possível. Nos casos em que se obtiveram valores demasiado altos (acima de 0,5) repetiu-se a leitura do padrão.

Após a leitura de todas as soluções padrão, o aparelho constrói, automaticamente, um gráfico em que o eixo das abcissas é a concentração do padrão em µg/mL e o eixo das ordenadas é a absorvância. Este gráfico resultante corresponde à curva de calibração para o componente especificado. Procedeu-se ao ajuste da curva de calibração, sempre que a linearidade não foi tão próxima de 1,00000, quanto o ideal.

Após construídas as curvas de calibração foram efetuadas as leituras das amostras. Para tal, mergulhou-se o tubo de aspiração do espectrofotômetro nos balões de 100 mL, (fez-se a leitura em triplicado) e registou-se o valor da concentração média, em µg/mL. Da mesma forma que anteriormente, o desvio padrão foi controlado durante as leituras e nos casos em que foi superior a 1,0, repetiu-se a análise. Durante as leituras, em intervalos regulares (quatro análises), verificou-se se o desvio era superior a 5% em relação às concentrações dos padrões. Para tal leu-se o padrão da gama de concentração que se estava a operar. Nos casos em que o desvio foi superior a 5%, fez-se o reajuste do zero, fazendo um “autozero” do padrão 1 (0 µg/mL). De seguida voltou a ler-se o padrão da gama de concentração em que se estava a operar e verificou-se se a concentração estava próxima do valor de concentração do padrão. Alternativamente, pode-se voltar a construir uma nova curva de calibração.

O cálculo das concentrações em mg/ 100g foi e deve ser feito um cálculo com base na seguinte expressão:

$$\text{Concentração} \left(\frac{\text{mg}}{100\text{g}} \right) = \frac{(C \times D) - B}{M \times 10} \times V$$

Sendo B – Concentração do branco, em µg/mL; C – A concentração de Cálcio/Ferro obtida, em µg/mL; D – Fator de diluição; V – Volume da solução inicial sem diluição (50 mL); M – Toma do produto, em g; 10 – Fator de conversão de µg/mL para mg/100g.

3.3.2. Procedimento para doseamento de ácido ascórbico por Titulação Potenciométrica

O procedimento descrito de seguida foi adaptado da instrução interna da Nestlé (Anónimo, 2009). Para efetuar a análise de vitamina C utilizaram-se os reagentes, materiais e equipamentos enumerados na tabela 5.

Tabela 5 – Reagentes, materiais e equipamentos utilizados na Titulação Potenciométrica.

Reagentes	Equipamentos
<ul style="list-style-type: none"> • Ácido Metafosfórico, Ref. 1.00546 • α-Amilase de Bacillus subtilis, 50 unidades/mg, Ref. Sigma Aldrich 10065 • Sal de sódio dihidratado 2,6-Diclorofenol-indofenol, Ref. 1.03028 • Ácido Acético 100%, Ref. 1.00063 • Ácido ascórbico L(+), Ref.1.00127 	<ul style="list-style-type: none"> • Balança Mettler Toledo PG2002-S, Precisão 0,01g • Titulador Metrohm 65S Dosimat • Estufa Heraeus B 5042, 45°C • Material: balões de vidro âmbar, colher metálica, agitador magnético, funis de vidro, filtro de papel, EPI.

3.3.2.1. Preparação de Soluções

Para este método foi necessário proceder à preparação de algumas soluções.

Para preparar a Solução Mãe de Ácido Metafosfórico, 100 g/L, pesaram-se, para uma proveta de 600 mL, 50,0 g \pm 0,5 g de ácido metafosfórico, adicionaram-se 500 mL de água, e de seguida mexeu-se até dissolução total. Depois de dissolvido, transferiu-se a solução para um balão de vidro âmbar.

Para a preparação da Solução de Ácido Metafosfórico, 20 g/L, pipetaram-se, para um balão volumétrico de 500 mL, 100 mL da solução mãe de ácido metafosfórico preparada anteriormente e fez-se o volume com água ultrapura.

Para a preparação da Solução Padrão de ácido ascórbico, 0,5 mg/mL, pesaram-se, para um balão de vidro âmbar de 100 mL, 50,0 mg \pm 1 mg de ácido ascórbico, dissolveu-se e fez-se o volume com a solução de ácido metafosfórico (20 g/L).

Para preparar a Solução de 2,6-Diclorofenol-indofenol, 0,5 mg/mL, dissolveram-se, numa proveta de 50 mL, 100,0 mg \pm 1 mg de DCPIP com 20 mL de água. Enquanto se agitou a solução, levou-se a mesma rapidamente à fervura. De seguida, aguardou-se que a solução arrefecesse até à temperatura ambiente e transferiu-se para um balão volumétrico de 200 mL, perfazendo-se o volume com água. Por último, filtrou-se a solução com um filtro de papel dobrado.

Para preparar a Solução de Ácido Acético 10% (v/v), introduziram-se, num balão volumétrico de 1000 mL, 500 mL de água e adicionaram-se 100 mL de ácido acético 100%. Posteriormente, fez-se o volume com água.

Para a preparação da Solução de Ácido Ascórbico (para teste de verificação do instrumento), 0,25 mg/mL, pesaram-se, para um balão de vidro âmbar de 100 mL, 25,0 mg \pm 0,1 mg de ácido ascórbico, dissolveu-se e fez-se o volume com a solução de ácido metafosfórico (20 g/L).

3.3.2.2. Procedimento para a calibração

Pesaram-se, para um balão de vidro âmbar de 100 mL, 2,0 mL de solução padrão de ácido ascórbico e adicionaram-se 30 mL \pm 2 mL de solução de ácido metafosfórico (20 g/L) e 5 mL de solução de ácido acético 10% (v/v). Para a titulação foi utilizada a solução de DCPIP, tendo-se atingido o ponto de viragem quando a coloração cor-de-rosa da solução persistiu por pelo menos 15 segundos. Após a titulação, registou-se o volume gasto de solução de DCPIP (V_{f1}). Posteriormente, repetiram-se os passos anteriores com novo volume de 2,0 mL de solução padrão de ácido ascórbico e registou-se o volume gasto de solução de DCPIP (V_{f2}). Para obter um único volume final fez-se a média dos 2 volumes (V_{f1} e V_{f2}), atentando-se à diferença entre estes, a qual deveria ser inferior a 5%.

3.3.2.3. Preparação de amostras para titulação potenciométrica

Após preparadas as soluções necessárias para o doseamento de ácido ascórbico por titulação potenciométrica, preparam-se as amostras. Começou-se por pesar, para um balão de vidro âmbar de 100 mL, $1,000 \text{ g} \pm 0,005 \text{ g}$ da amostra e registou-se a massa pesada. De seguida, adicionaram-se cerca de 20 mL de água, agitou-se vigorosamente a solução e adicionaram-se 20 mL de solução de ácido metafosfórico (100 g/L), agitando-se de novo a solução vigorosamente. Perfez-se o volume com água ultrapura. Por último diluiu-se a solução com água de forma a obter a concentração final de 0,1- 0,2 mg/mL de vitamina C.

3.3.2.4. Análise, por titulação potenciométrica, das amostras preparadas

Para a análise das amostras, começou-se por pipetar, para uma proveta de 100 mL, uma parte alíquota da solução preparada anteriormente, contendo 0,5 a 2 mg de ácido ascórbico. De seguida, adicionou-se $30 \text{ mL} \pm 2 \text{ mL}$ da solução de ácido metafosfórico (20 g/L) e 5 mL da solução de ácido acético 10% (v/v). Para a titulação foi utilizada a solução de DCPIP, tendo-se atingido o ponto de viragem quando a coloração cor-de-rosa da solução persistiu por pelo menos 15 segundos. Após a titulação, registou-se o volume gasto de solução de DCPIP.

3.4. Métodos de Análise Alternativos

A preparação das amostras para análise pelos métodos alternativos foi fácil e rápida. Em ambos os métodos, efetuou-se a análise da amostra, com preparações distintas, e o aparelho guardou e processou a informação resultando uma resposta. Foram gerados relatórios onde foram tabelados os valores de referência da amostra (os valores introduzidos resultantes da análise pelo método de referência), os valores alternativos (a resposta do aparelho) e as suas diferenças.

3.4.1. Procedimento para análise das amostras para análise por XRF

Para efetuar a análise de cálcio e ferro utilizaram-se os materiais e equipamentos enumerados na tabela 6.

Tabela 6 – Materiais e equipamentos utilizados na preparação de amostras para análise de Espetroscopia de XRF.

Materiais e Equipamentos
<ul style="list-style-type: none">• Espectrofotómetro de XRF• Prensa Hidráulica Atlas™ Power Specac, 25 ton• Balança Kern EG., Precisão 0,01 g• Material: componentes da prensa, colher metálica, EPI.

3.4.1.1. Preparação da amostra

Após verificar se os componentes da prensa estavam bem limpos, montou-se o conjunto metálico da seguinte forma:

- Colocou-se o disco metálico sobre a base do cilindro, com a parte espelhada voltada para cima;
- Encaixou-se o cilindro em cima do conjunto anterior e exerceu-se pressão sobre o cilindro de modo a acoplar os três componentes.

Depois de devidamente montado o conjunto, colocou-se o mesmo na balança e procedeu-se à sua calibração. De seguida, pesaram-se, com a colher metálica pequena, 8,00 g de amostra para o interior da câmara do conjunto da prensa. Retirou-se o conjunto da balança e introduziu-se o pistão na câmara com a superfície espelhada em contacto com a amostra e pressionou-se até sentir ligeira pressão. Colocou-se o conjunto dentro da prensa, centrou-se o mesmo na base e rodou-se a rosca da prensa até o êmbolo atingir a contração máxima, em contacto com o conjunto metálico.

Posteriormente, ligou-se a prensa, regulou-se a pressão de acordo com o produto e acionou-se o botão de compressão. Para as pré-misturas do grupo 1b a pressão utilizada foi de 4 toneladas (ton) e para as restantes pré-misturas de 8 ton. Sempre que ocorreu diminuição de pressão, fez-se o

ajuste para a pressão selecionada, carregando no botão de compressão. Passado o tempo de compressão (um minuto) retirou-se da prensa o conjunto metálico e desmontou-se o mesmo, como ilustrado na figura 10.

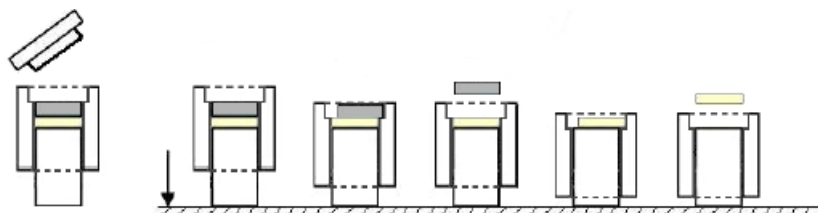


Figura 10 – Procedimento para retirar a pastilha do conjunto metálico.

3.4.1.2. Análise das amostras no aparelho XRF

Após formada a pastilha, esta foi colocada numa das posições do suporte rotativo da prensa e procedeu-se à sua análise. No programa de análise criou-se uma nova aplicação para fazer uma curva de calibração para cada pré-mistura. As condições de operação ótimas foram configuradas de acordo com a tabela 7.

Tabela 7 – Condições de operação ótimas para análise de cálcio e ferro em pré-misturas constituintes de produtos de nutrição infantil.

Código Canal	Composto (g/100g)	ROI min.	ROI máx.	Condição	Tempo análise (s)	Voltagem (kV)	Corrente (μA)	Filtro	Meio
Bg		10.5	11.1	<K-Zn>	120	20.00	250	Alumínio	Ar
Ca	Cálcio								
Fe	Ferro								

O canal de *background* (Bg) tem como função eliminar as interferências de ruído do aparelho. As colunas com o tempo de análise, a voltagem, a corrente, o filtro e o meio são características da condição <K-Zn>.

Posteriormente, inseriu-se a descrição da amostra e o resultado de concentração obtido pelo método analítico de referência, procedeu-se à análise de dois duplicados da mesma amostra e guardaram-se os resultados obtidos. Para construir a curva de calibração foram lidas todas as amostras e, depois, procedeu-se aos cálculos estatísticos.

3.4.2. Procedimento para leitura das amostras para análise por FT-NIR

Para efetuar a análise de vitamina C utilizaram-se os materiais e equipamentos enumerados na tabela 8.

Tabela 8 – Materiais e equipamentos utilizados na preparação de amostras para análise de Espetroscopia de NIR.

Materiais e Equipamentos
<ul style="list-style-type: none">• Espectrofotômetro de FT-NIR modelo MPA (<i>Multi Purpose Analyzer</i>) da Bruker Optik GmbH Germany• Suporte para frascos de 22mm, Bruker XN-582V• Frascos de vidro com 22 mm de diâmetro• Material: colher metálica, EPI.

3.4.2.1. Preparação da amostra

A análise deste tipo de amostras foi feita em frascos de vidro de 22 mm de diâmetro, colocando-se para esta análise o suporte adequado à leitura. Depois de corretamente selecionado o suporte, encheu-se, com a colher metálica pequena, cerca de $\frac{3}{4}$ do frasco com a amostra a ler de modo a que a amostra ficasse condensada para ocupar o respetivo volume no frasco. Colocou-se o frasco na posição de leitura do aparelho NIR e procedeu-se à sua análise.

3.4.2.2. Análise das amostras no aparelho NIR

Para se efetuar esta análise, inseriu-se a descrição da amostra e analisou-se cada amostra em duplicado. Os espectros resultantes das leituras foram guardados no computador.

Para a construção da curva de calibração procedeu-se desta forma para todas as amostras, e fez-se corresponder a cada amostra o resultado obtido pelo método analítico de referência. Posteriormente, os dados foram tratados estatisticamente.

3.5. Análise Estatística dos Dados

Após se efetuar a análise de todas as amostras em ambos os equipamentos, procedeu-se à análise estatística, pelo SPSS. Como resultado da análise das amostras ambos os programas disponibilizam um relatório final, onde são apresentados os valores médios de referência (inseridos anteriormente pelo operador), os valores estimados pelo modelo criado pelo programa bem como as respectivas diferenças entre estes valores. Com estes resultados, fez-se a média dos resultados obtidos pelos métodos alternativos e calcularam-se as diferenças entre o resultado referência médio e o resultado alternativo médio.

Estes resultados de cálcio, ferro e vitamina C foram colocados no *software* estatístico SPSS e foi realizada uma análise por regressão linear. A utilização de uma ferramenta estatística externa é necessária uma vez que, por um lado fornece informação sobre a confiabilidade inerente ao modelo matemático implementado bem como o erro a este associado, e por outro lado porque são requeridos relatórios de validação em auditorias, pelo que é necessário validar os cálculos efetuados pelos equipamentos com ferramentas estatísticas como o SPSS. A aplicação da regressão linear implica que certas condições estejam garantidas, entre as quais: distribuição normal dos resíduos, aleatoriedade e independência dos resíduos e variância constante. De forma a garantir estas condições de aplicabilidade da regressão linear, o programa SPSS, nos casos em que há essa necessidade, sugere a exclusão de alguns pontos do conjunto amostral inicial. Estes pontos foram analisados e, em alguns casos, foram excluídos do conjunto amostral e definiu-se o modelo matemático mais adequado. De forma a garantir que ambos os equipamentos de análise alternativa continham os modelos mais adequados e que traduziam uma confiabilidade maior em termos estatísticos, os pontos anteriormente identificados foram também excluídos do conjunto amostral inicial, presente em cada um dos programas dos equipamentos alternativos de análise.

Para além desta análise estatística avaliou-se a reprodutibilidade dos equipamentos com base no cálculo de medidas de dispersão como o desvio padrão.

Assim, o desvio padrão permite fazer uma inferência acerca da variabilidade de uma população de grandes dimensões a partir de uma amostra aleatória limitada, sendo expresso nas mesmas unidades dos dados a partir dos quais é calculado (Cabral e Sarsfield, 1997). Assim, este desvio padrão amostral (SD_s) é calculado com recurso à seguinte equação:

$$SD_s = \sqrt{\frac{(X - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

O coeficiente de variação de *Pearson* ou desvio padrão relativo (RSD), cuja relação é feita com a média, é também uma medida de dispersão (Cabral e Sarsfield, 1997). O seu resultado obtém-se pela razão entre o SD_s e a média, pela seguinte equação:

$$RSD (\%) = \frac{SD_s}{\bar{X}} \times 100$$

4. Resultados e Discussão

4.1. Amostras Experimentais

Como referido anteriormente, a elaboração das amostras experimentais foi feita segundo a receita de cada produto contudo, nem sempre os resultados obtidos para cálcio, ferro e vitamina C foram de encontro aos teóricos. As figuras a seguir apresentadas mostram a diferença entre os resultados obtidos pela análise por EAA ou Titulação Potenciométrica e os resultados teóricos de acordo com a receita. Com os resultados obtidos da análise por EAA e por Titulação Potenciométrica das amostras retiradas diretamente da linha de produção fez-se uma previsão dos possíveis resultados de amostras mais e menos concentradas. Confrontaram-se estes possíveis resultados previstos com os dois resultados referidos anteriormente, de forma a perceber se a produção das amostras experimentais em laboratório era mais próxima do valor teórico (receita) ou do valor real (linha de produção). Contudo, os resultados relativos às amostras provenientes da linha de produção não são representativos, uma vez que as vinte e cinco amostras foram retiradas de um único misturador, constituindo assim apenas uma mistura, pelo que as conclusões a tirar destes resultados não devem ser generalizadas para a produção habitual da fábrica.

Para cada pré-mistura são apresentados dois gráficos, sendo que no primeiro estão representados os resultados para cálcio e vitamina C e no segundo estão os de ferro. As figuras numeradas de 11 a 18 representam os resultados de pré-misturas do grupo 1a, as figuras de 19 a 24 correspondem ao grupo 1b e os resultados relativos às amostras experimentais dos grupos 2 e 3 estão representados nas figuras 25 a 26 e 27 a 28, respetivamente.

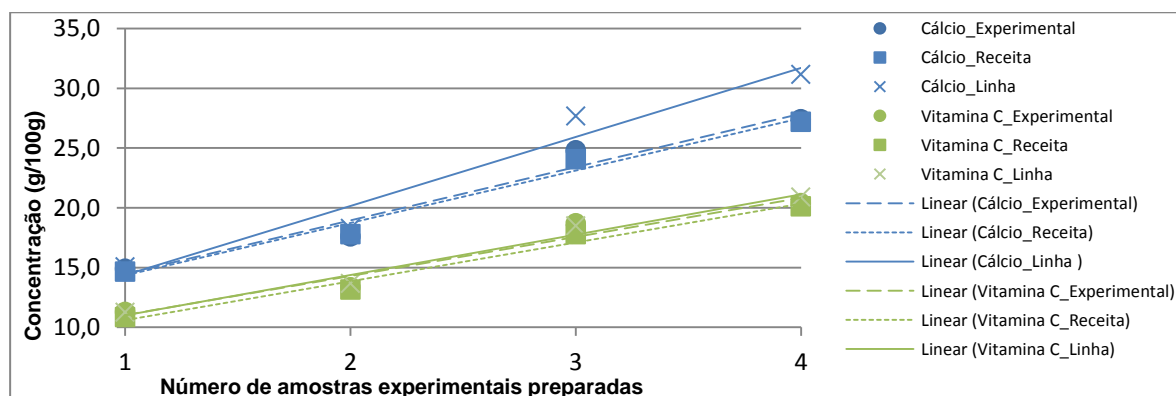


Figura 11 – Comparação gráfica entre as concentrações de cálcio e vitamina C obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha láctea Simples.

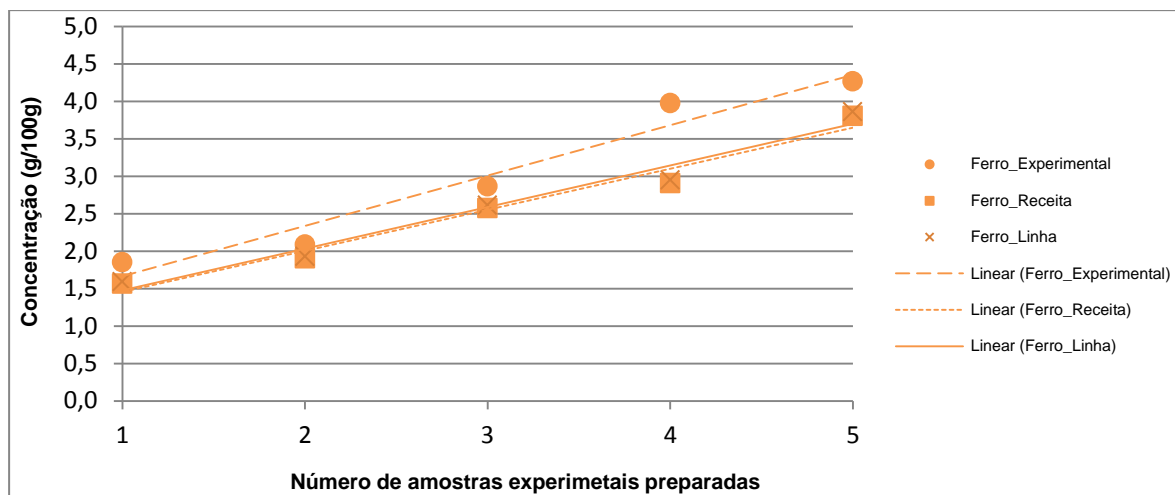


Figura 12 – Comparação gráfica entre as concentrações de ferro obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha láctea Simples.

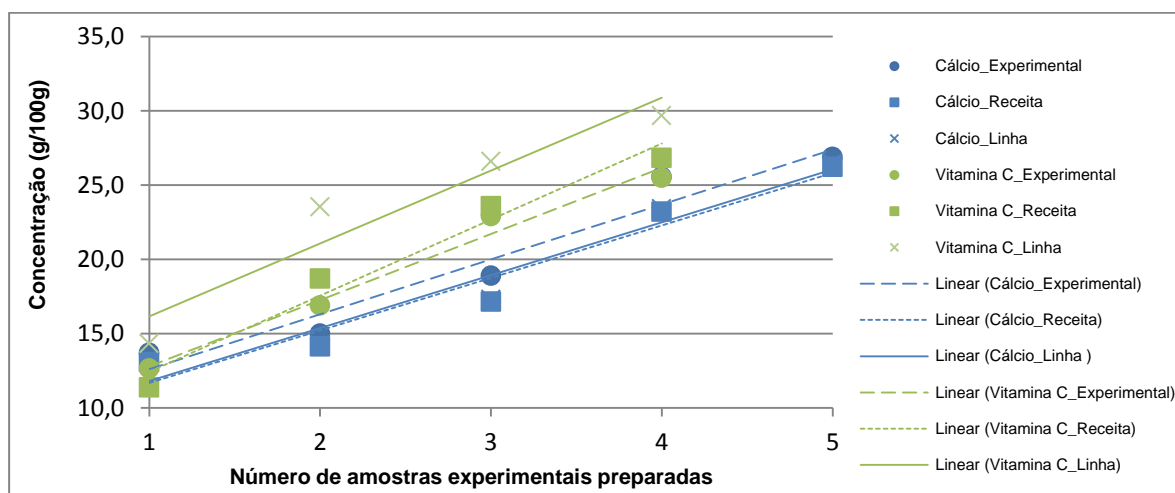


Figura 13 – Comparação gráfica entre as concentrações de cálcio e vitamina C obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha láctea com Pera.

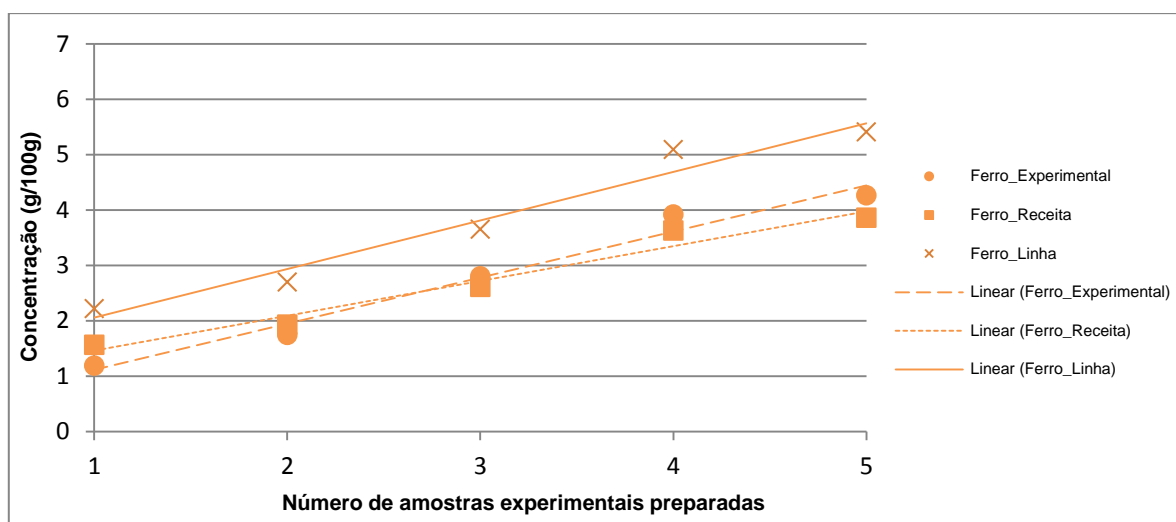


Figura 14 – Comparação gráfica entre as concentrações de ferro obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha láctea com Pera.

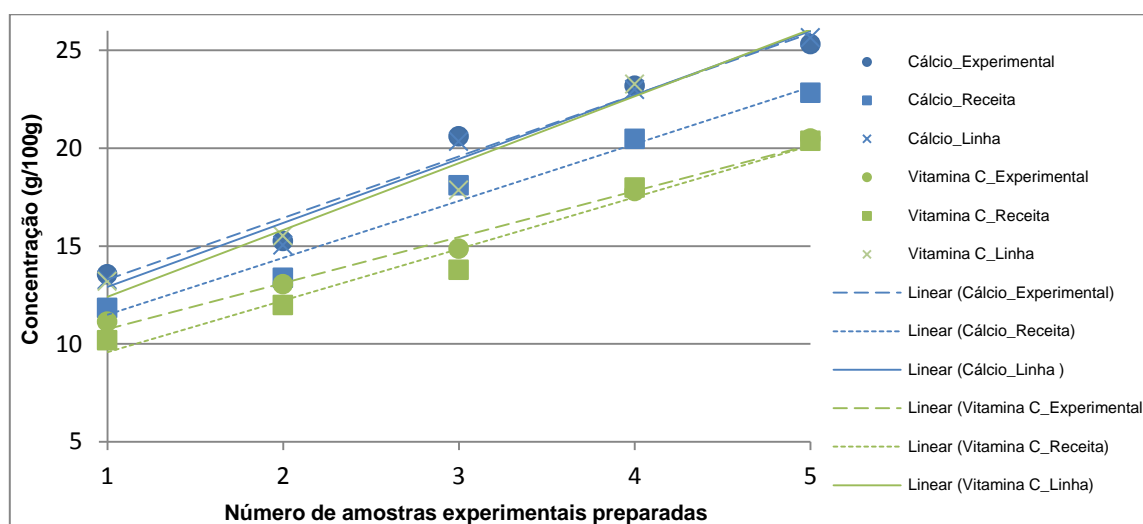


Figura 15 – Comparação gráfica entre as concentrações de cálcio e vitamina C obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha láctea com Maçã.

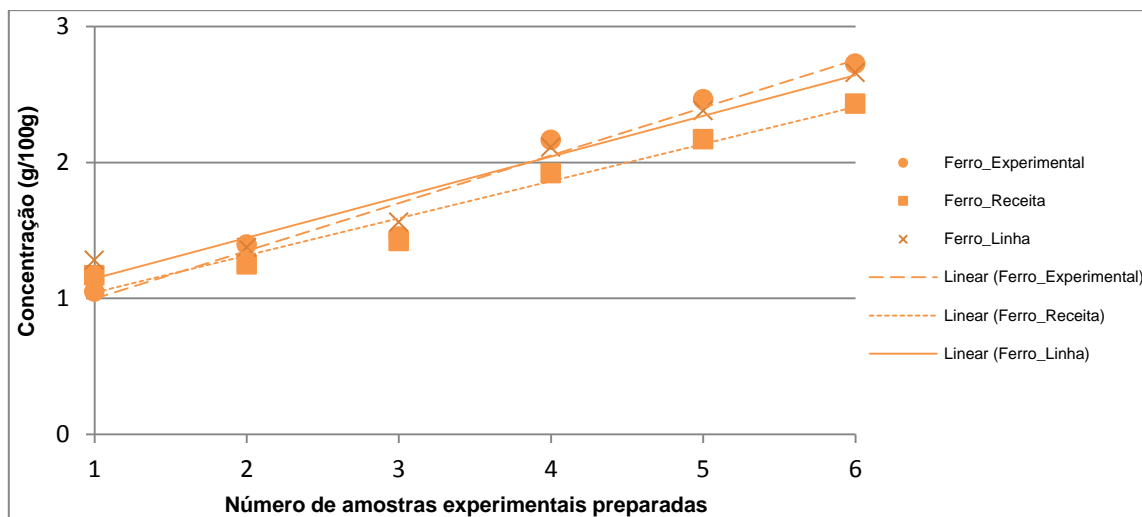


Figura 16 – Comparação gráfica entre as concentrações de ferro obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha láctea com Maçã.

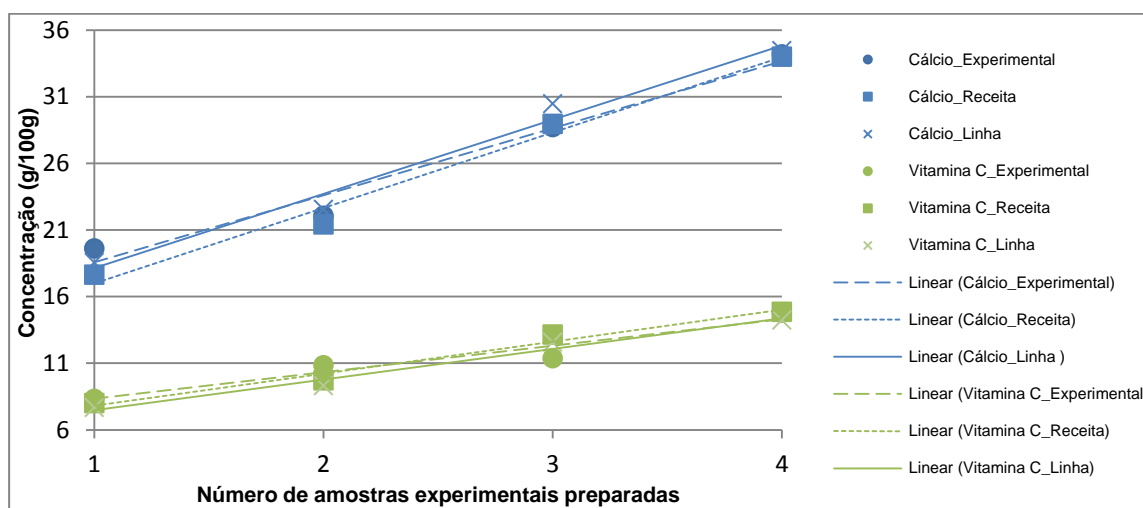


Figura 17 – Comparação gráfica entre as concentrações de cálcio e vitamina C obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha láctea com Tâmaras.

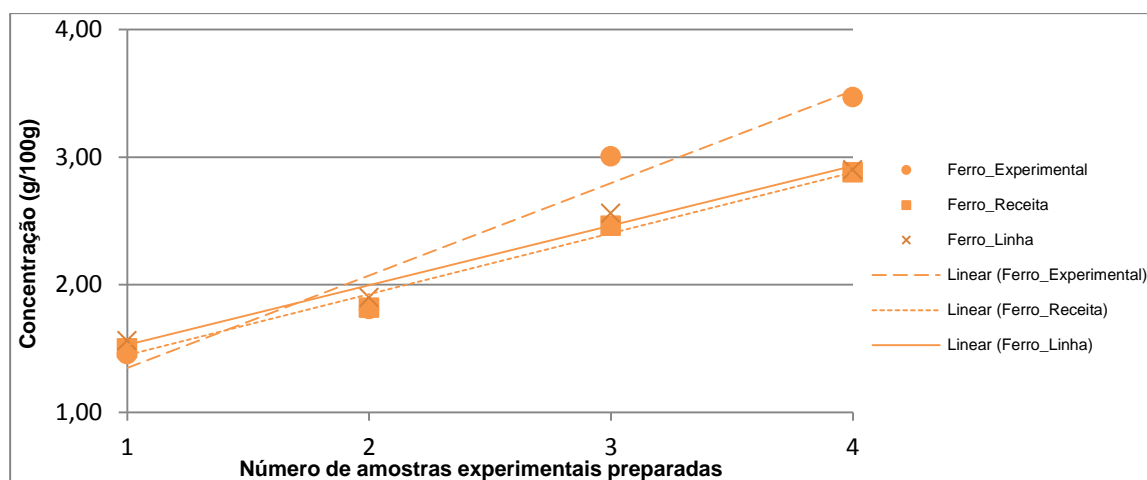


Figura 18 – Comparação gráfica entre as concentrações de ferro obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha láctea com Tâmaras.

Para este grupo de pré-misturas, no qual o ferro foi adicionado individualmente como fumarato de ferro, de uma maneira geral, os resultados das amostras elaboradas no laboratório bem como das provenientes da linha de produção, são normalmente superiores aos valores esperados de acordo com a receita. No que diz respeito ao ferro e ao cálcio seria de esperar que os resultados quer da linha de produção quer das amostras experimentais tivessem concentrações similares às da receita, uma vez que são adicionados individualmente. Quanto à vitamina C não é de todo inesperado que estes resultados não coincidam com os da receita uma vez que, para além da variabilidade assumida entre lotes, esta já vem incorporada na matriz de vitaminas, a qual pode não ter a homogeneidade ideal.

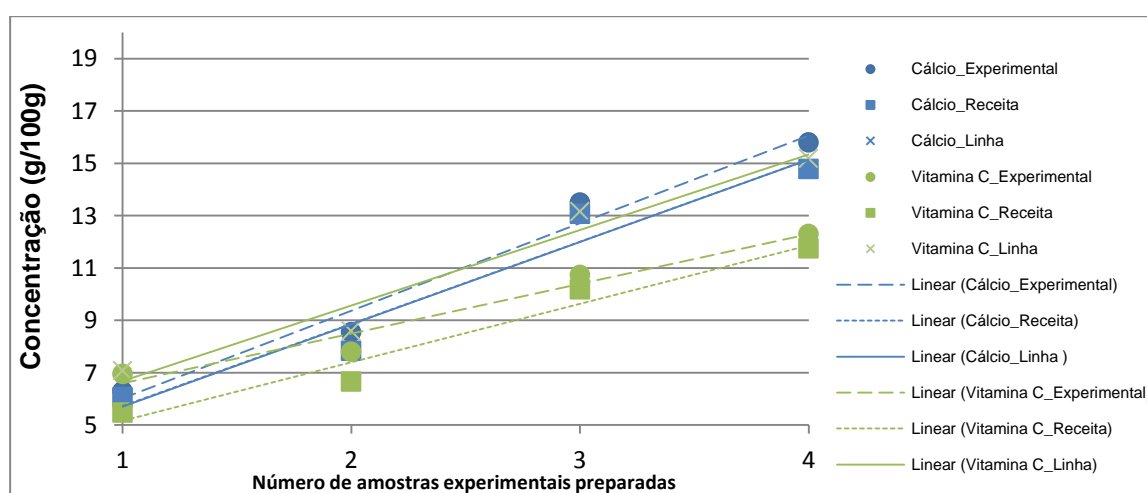


Figura 19 – Comparação gráfica entre as concentrações de cálcio e vitamina C obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha láctea com Banana.

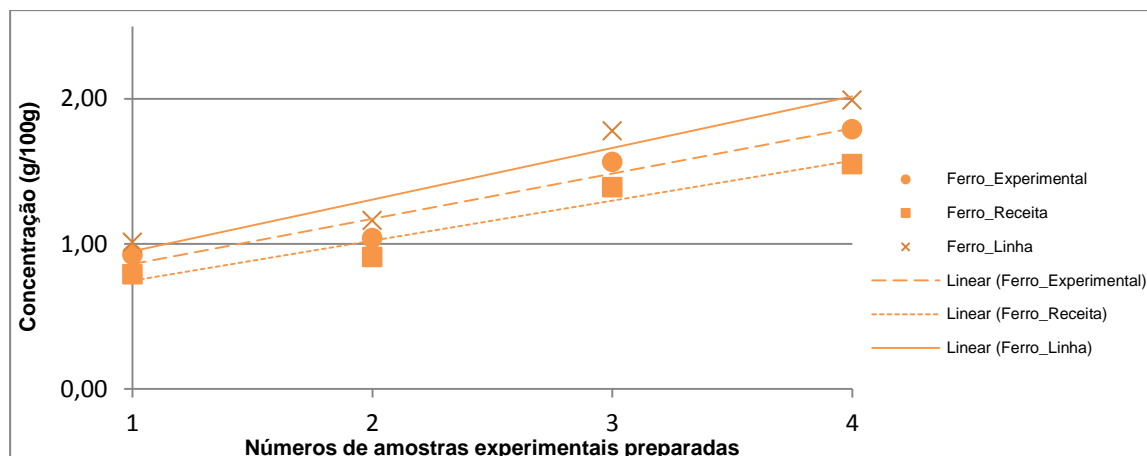


Figura 20 – Comparação gráfica entre as concentrações de ferro obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha láctea com Banana.

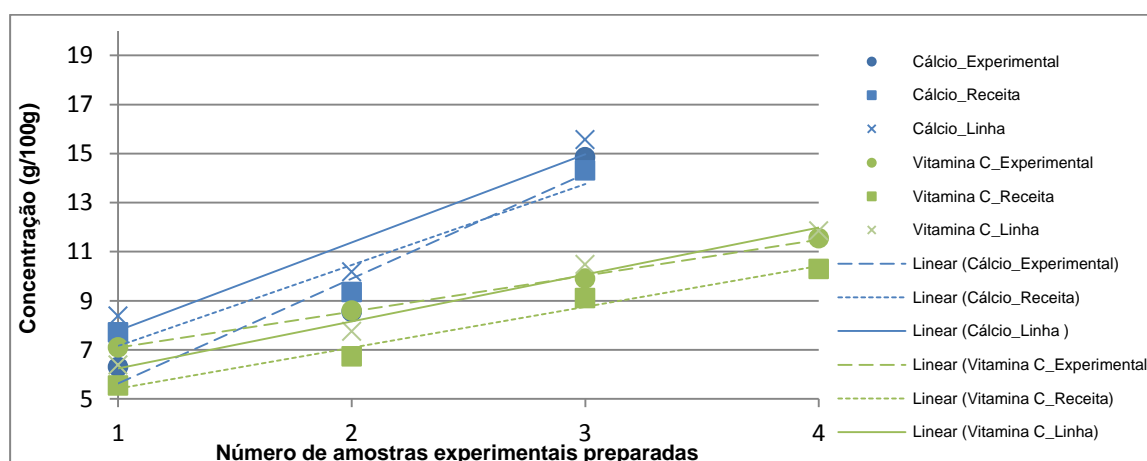


Figura 21 – Comparação gráfica entre as concentrações de cálcio e vitamina C obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha láctea Multifrutos.

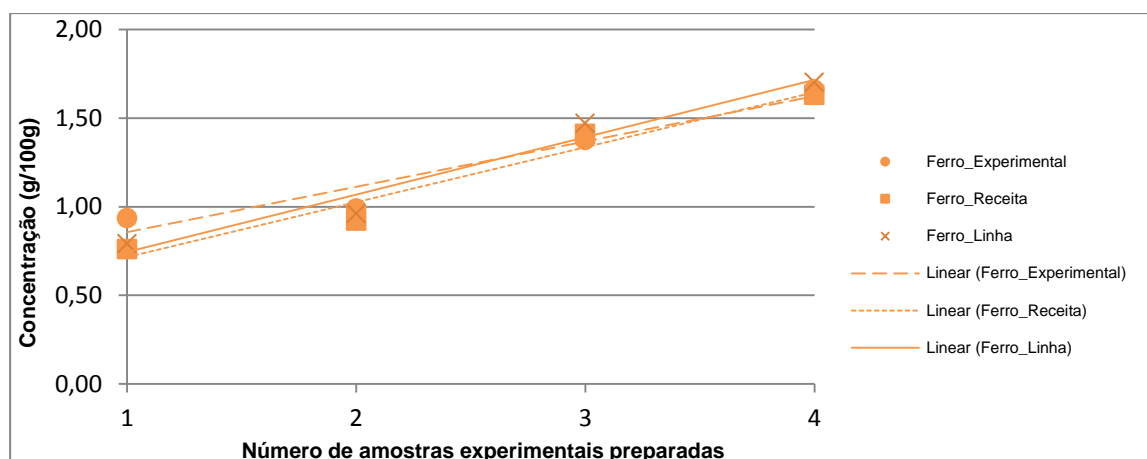


Figura 22 – Comparação gráfica entre as concentrações de ferro obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha láctea Multifrutos.

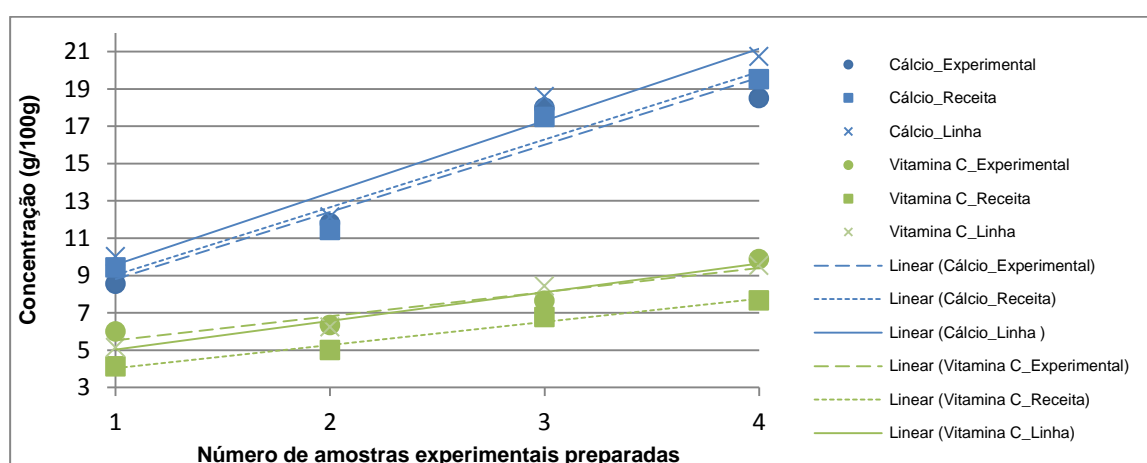


Figura 23 – Comparação gráfica entre as concentrações de cálcio e vitamina C obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha láctea com Frutos.

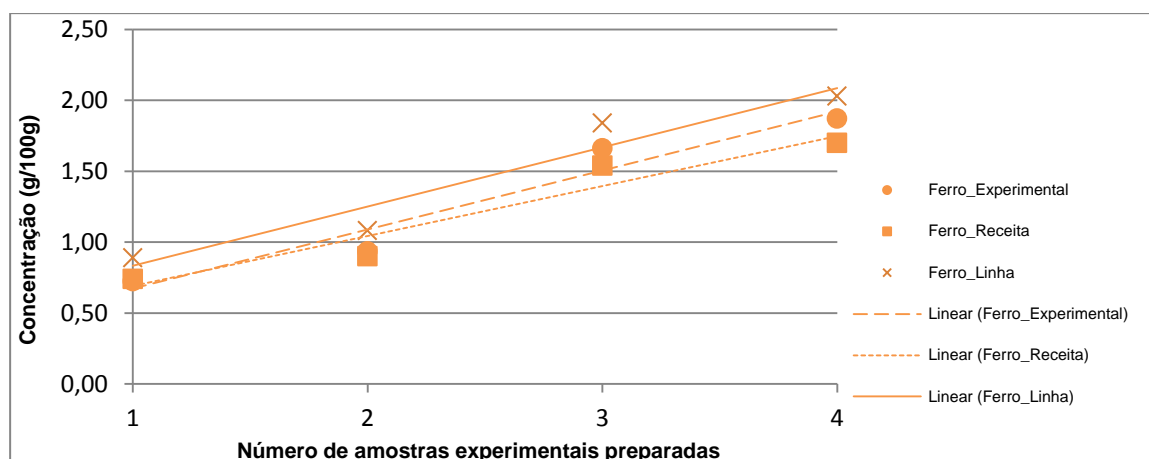


Figura 24 – Comparação gráfica entre as concentrações de ferro obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha láctea com Frutos.

Para este grupo de pré-misturas, o ferro foi adicionado como pirofosfato de ferro, incorporado no *Trace Elements*. Como no caso anterior, os resultados das amostras elaboradas em laboratório bem como das provenientes da linha de produção, são quase sempre superiores aos valores esperados de acordo com a receita. Uma vez que o ferro já vem incorporado numa matriz, é compreensível que os seus valores possam não estar tão próximos quanto o ideal da receita, pela mesma razão apresentada anteriormente para o caso da vitamina C. As concentrações de vitamina C obtidas nas amostras experimentais foram muito próximas das concentrações da linha de produção, o que mostra que a mimetização da receita é difícil quer em pequena ou grande escala, o que vem corroborar a hipótese de que a homogeneidade inicial do *vitamin premix* poderá não ser a ideal.

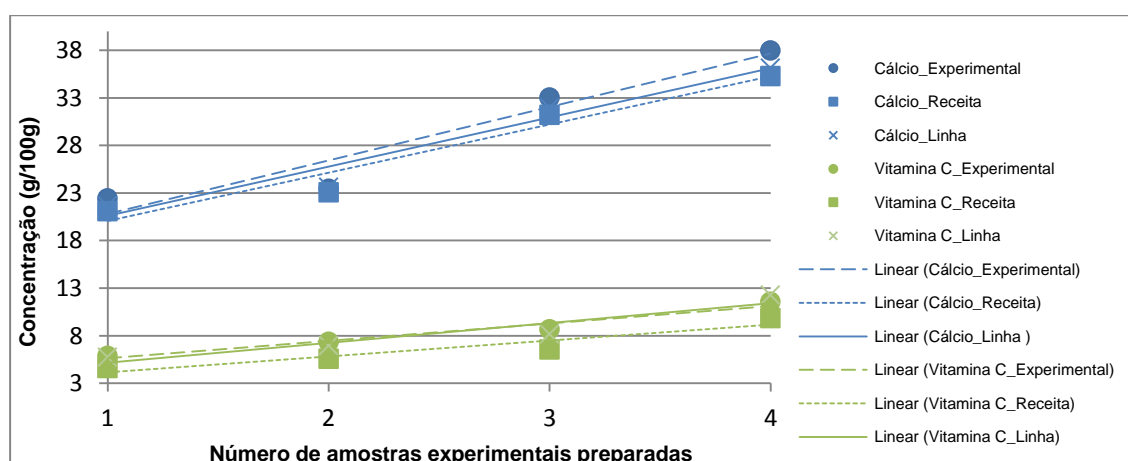


Figura 25 – Comparação gráfica entre as concentrações de cálcio e vitamina C obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha não láctea Multifrutos.

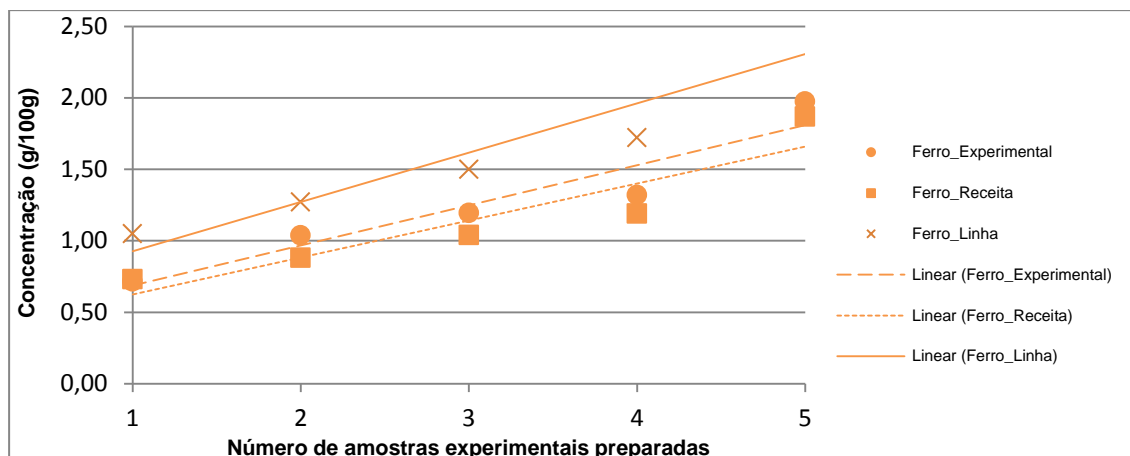


Figura 26 – Comparação gráfica entre as concentrações de ferro obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha não láctea Multifrutos.

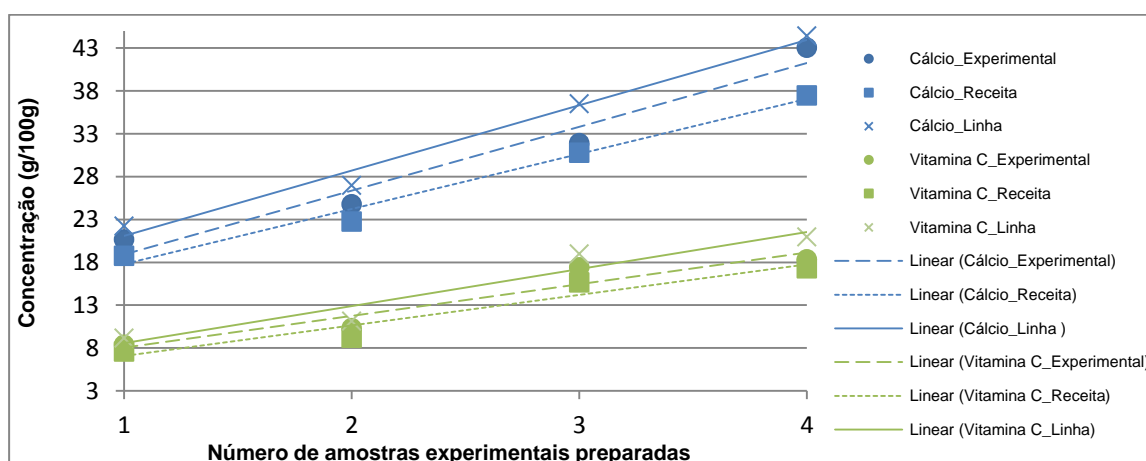


Figura 27 – Comparação gráfica entre as concentrações de cálcio e vitamina C obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha não láctea Simples.

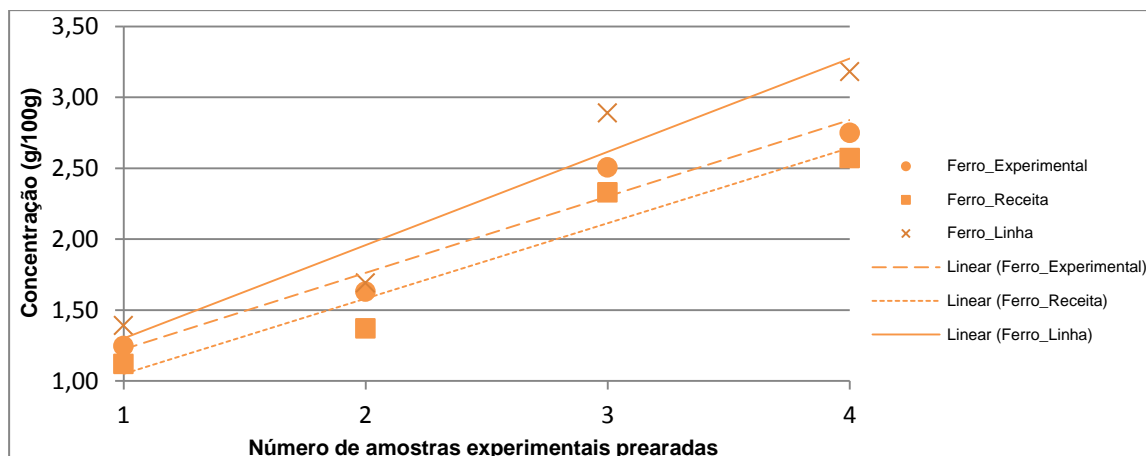


Figura 28 – Comparação gráfica entre as concentrações de ferro obtidas pelos métodos analíticos de referência e os resultados esperados de acordo com a receita e de acordo com a linha de produção das amostras experimentais da pré-mistura da farinha não láctea Simples.

Para estes dois últimos grupos de pré-misturas, o ferro foi adicionado na forma de fumarato de ferro, incorporado num *vitamin premix*. Nestes casos, há uma diferença mais notória nos resultados, nos quais as concentrações das amostras provenientes da linha de produção são superiores às concentrações das amostras preparadas em laboratório e estas por sua vez superiores às concentrações calculadas de acordo com a receita. Uma vez que o ferro e a vitamina C já vêm incorporados numa matriz, é compreensível que os seus valores possam não estar tão próximos quanto o ideal da receita, pelas mesmas razões apresentadas anteriormente.

A mistura dos aromas, do carbonato de cálcio, do fumarato de ferro/*Trace Elements* e do *Vitamin Premix* pode ser considerada uma mistura de vários pós (Coelho, n.d.). Uma boa mistura idealmente tem a mesma composição seja qual for, e de que tamanho for, a amostra retirada. Contudo, em termos práticos atingir este grau de mistura é muito difícil pelo que normalmente o objetivo é obter uma mistura aleatória, isto é, uma mistura em que a probabilidade de encontrar uma partícula de um constituinte é a mesma em todos os pontos da mistura, e igual à proporção em que o constituinte entra na mistura (Fortitech Premixes, 2013). As amostras retiradas de uma mistura deste género não terão exatamente a mesma composição mas as diferenças serão pequenas.

Há essencialmente dois processos aplicados na indústria alimentar para a elaboração de uma mistura homogénea, sendo estes a mistura a seco (*dry-blending*) ou a granulação húmida (*wet-granulation*) (Telko e Hickey, 2005; Fortitech Premixes, 2013). Na produção de *premixes* normalmente usa-se a mistura a seco. As propriedades dos pós, nomeadamente propriedades físico-químicas e morfológicas das partículas constituintes e a sua distribuição de tamanhos, contribuem para a variabilidade, sendo este um aspeto crítico na mistura (Fortitech Premixes, 2013). Assim, é importante considerar algumas das suas propriedades, nomeadamente a fluidez, o tamanho das partículas, a forma e a densidade (Fortitech Premixes, 2013).

Uma vez que parte dos componentes da pré-mistura já vem misturada do fornecedor, estas questões foram tidas como já revistas e otimizadas. Na elaboração de *premixes*, fatores como o tipo

de misturadores, tempo de mistura e ordem de mistura são determinantes na elaboração de misturas de qualidade (Avitech Animal Health Pvt., 2007). A avaliação da mistura deve ser feita com base no cálculo dos coeficientes de variação, o qual deve ser menor que 5% para caracterizar uma mistura excelente (Avitech Animal Health Pvt., 2007).

Na elaboração das misturas, em laboratório, tiveram-se em atenção alguns fatores importantes. Aquando da pesagem dos componentes, pesou-se em primeiro lugar o componente que apresentava uma maior porção na mistura. Este procedimento evita que os componentes de menor proporção se fixem nas paredes do misturador (Fortitech Premixes, 2013). Também se teve a preocupação de não colocar em último lugar os componentes mais finos e menos densos uma vez que este procedimento demonstrou ter melhores resultados em termos da homogeneidade da amostra, por, aparentemente, se misturar mais facilmente. Um estudo sobre misturas levado a cabo pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa concluiu que o método de carga do misturador influencia o tipo de variação do grau de mistura (Coelho, n.d.). No caso em que o componente mais fino ficou por baixo, isto é foi o primeiro a ser pesado, o grau de mistura aumentou gradualmente, enquanto que no caso em que o componente mais fino ficou por cima, isto é, foi pesado em segundo lugar, o grau de mistura atingiu um máximo e depois diminuiu tendendo para o mesmo grau de mistura que o caso anterior (Coelho, n.d.).

A velocidade e o tempo de mistura foram selecionados após alguns testes efetuados, nos quais foram experimentadas várias combinações destes dois parâmetros. Posteriormente, analisaram-se, em duplicado, as várias amostras pelo método de análise de referência de forma a perceber em qual das combinações houve uma diferença menor entre os dois resultados. Optou-se por fazer a mistura a 5000 rpm durante 30 segundos, em dois ciclos (totalizando, assim, um minuto de tempo de mistura a 5000 rpm), para minimizar o tempo de exposição da mistura, em especial do ácido ascórbico, a temperaturas ligeiramente mais elevadas. A manutenção da velocidade durante um período de tempo maior resultou no aquecimento do misturador, o qual poderia influenciar os teores de vitamina C, pelo facto de esta ser termolábil (Mahan e Escott-Stump, 2008).

4.2. Resultados obtidos pelos métodos de análise

Cada amostra foi analisada e foram obtidos dois resultados alternativos correspondentes a cada um dos duplicados das amostras. De forma a avaliar a reprodutibilidade do método foi calculado o desvio padrão relativo dos duplicados, tendo sido calculada a média do desvio observada em cada pré-mistura, para cálcio, ferro e vitamina C, considerando o conjunto amostral total utilizado para construir as curvas de calibração. Estes resultados estão resumidos na tabela 9.

Tabela 9 – Médias dos desvios padrão relativos (%) dos duplicados para as pré-misturas estudadas, obtidas na quantificação de cálcio, ferro e vitamina C.

	Pré-misturas	RSD (%)		
		Cálcio	Ferro	Vitamina C
Grupo 1a	Farinha Láctea Simples	1,56	2,68	1,68
	Farinha Láctea com Pera	0,81	2,05	1,40
	Farinha Láctea com Maçã	0,90	2,37	2,57
	Farinha Láctea com Tâmaras	0,47	3,70	1,63
	<u>Média</u>	0,93	2,70	1,82
Grupo 1b	Farinha Láctea Multifrutos	2,36	0,60	0,90
	Farinha Láctea com Banana	1,65	1,11	1,38
	Farinha Láctea com Frutos	1,29	0,72	1,14
	<u>Média</u>	1,77	0,81	1,14
Grupo 2	Farinha Não Láctea Multifrutos	0,79	2,12	1,88
Grupo 3	Farinha Não Láctea Simples	0,78	1,48	1,56

O desvio padrão calculado pode ser considerado o desvio padrão de reprodutibilidade intermédia, uma vez que foram utilizados o mesmo método de medição, o mesmo instrumento de medida, contudo em duplicados de uma mesma amostra. Este parâmetro permite avaliar a precisão do método, uma vez que se está a estudar a proximidade entre os dois valores obtidos.

Como se pode constatar pelo desvio padrão relativo (RSD), o elemento que apresenta um menor desvio padrão é o cálcio, significando que este é o elemento que apresenta menor variabilidade em torno da média. Pelo contrário, o elemento que apresenta um desvio padrão maior é o ferro, em particular nas pré-misturas do grupo 1a e pré-misturas do grupo 2. A vitamina C, na maioria das pré-misturas, apresenta resultados mais satisfatórios que o ferro, mas menos satisfatórios que o cálcio.

Comparando os resultados obtidos, relativamente ao ferro, com os de um estudo, cujo objetivo foi a quantificação de ferro, cobre e zinco em *premixes* alimentares, pode concluir-se que estes são similares. O desvio padrão observado nas amostras deste estudo variou entre 0,6% e 2,1% (Perring *et al.*, 2005).

Tanto no XRF como no NIR o sinal analítico corresponde à intensidade da radiação característica medida, o qual é proporcional à concentração do elemento na amostra que originou o sinal. Idealmente esta relação deveria ser linear, contudo, normalmente, esta linearidade não se verifica uma vez que há efeitos físicos e químicos da matriz do produto que interferem nesta medição (Kruus, 2010). Relativamente às características físicas da amostra que podem afetar a matriz podem-se destacar o tamanho das partículas constituintes, a uniformidade, a homogeneidade e, ainda, particularmente no caso das medições no XRF, a superfície da amostra (Kruus, 2010). Quanto aos efeitos químicos estes podem resultar essencialmente de interferência entre os elementos constituintes da amostra (Kruus, 2010).

Como referido anteriormente, as amostras foram elaboradas sempre nas mesmas condições, sendo os 100 gramas finais de amostra moídos e misturados no misturador atrás mencionado. Esta etapa objetivou, precisamente, eliminar possíveis fontes de erro, na medida em que tentou otimizar a amostra em termos de igualdade de tamanho de partículas, de homogeneidade e uniformidade. Na preparação da amostra para medição no XRF, em alguns casos a amostra ficou danificada na sua superfície, com ligeiras fissuras laterais e/ou centrais. Contudo, sempre que era formada uma pastilha com danos na sua superfície a amostra era rejeitada e procedia-se à elaboração de uma nova amostra. Com isto tentou-se ao máximo obter amostras com superfícies lisas sem fissuras ou lascas. Esta possível interferência das características físicas do produto pode ser de alguma forma controlada contudo, o controlo dos efeitos resultantes das características químicas da amostra já não é tão exequível.

Como referido no capítulo 3, as amostras foram analisadas inicialmente pelos métodos de análise de referência e, posteriormente, pelos métodos de análise alternativos. De acordo com os resultados obtidos, foram observadas diferenças negativas e diferenças positivas, havendo, portanto, uma aleatoriedade nas diferenças entre os resultados de referência e os resultados obtidos pelos métodos de análise alternativos. A tabela 10 apresenta o módulo do erro percentual relativo médio de cada um dos elementos em cada uma das pré-misturas estudadas. Este parâmetro permite avaliar a exatidão do método, uma vez que se está a estudar a proximidade do valor obtido ao valor real.

Tabela 10 – Médias do erro percentual relativo, em módulo, obtido para os valores de referência e alternativos médios obtidos para cálcio, ferro e vitamina C para cada uma das pré-misturas estudadas.

	Pré-misturas	Erro relativo (%)		
		Cálcio	Ferro	Vitamina C
Grupo 1a	Farinha Láctea Simples	3,65	5,65	2,79
	Farinha Láctea com Pera	3,46	9,52	3,22
	Farinha Láctea com Maçã	5,79	2,37	3,90
	Farinha Láctea com Tâmaras	2,94	4,68	2,06
	<u>Média</u>	3,96	5,56	2,06
Grupo 1b	Farinha Láctea Multifrutos	7,69	3,57	2,57
	Farinha Láctea com Banana	5,88	3,22	2,49
	Farinha Láctea com Frutos	6,63	2,78	1,96
	<u>Média</u>	6,63	3,19	2,34
Grupo 2	Farinha Não Láctea Multifrutos	2,18	11,52	2,33
Grupo 3	Farinha Não Láctea Simples	4,93	5,57	3,20

Verificou-se na maioria das pré-misturas que o erro relativo foi relativamente baixo, excetuando algumas amostras, as quais foram identificadas como *outliers* pelo programa estatístico utilizado. Na análise individual de cada pré-mistura, descrita adiante, os resultados desta tabela serão detalhadamente discutidos.

Os dados gerados pelos aparelhos de medição alternativos foram inseridos no programa SPSS e foi gerado um modelo matemático por regressão linear. Os modelos matemáticos resultantes

estão representados graficamente nas figuras 29 a 50, que podem ser consultadas em apêndice, no apêndice I. Para que fossem satisfeitas as condições de aplicabilidade da regressão, nomeadamente os resíduos seguirem uma distribuição normal, serem aleatórios e independentes e seguirem a hipótese da homocedasticidade, isto é, terem variância constante, houve necessidade de excluir do conjunto amostral inicial algumas amostras. A exclusão foi feita quando as amostras eram identificadas, pelo SPSS, como *outliers*, demonstrando assim um afastamento atípico em relação ao restante conjunto. Contudo, e de forma a ser o mais fiel possível aos resultados originais, apenas se procedeu à exclusão quando foi realmente necessário, isto é excluiu-se o menor número de amostras possíveis de forma a garantir as condições de aplicabilidade da regressão, já nomeadas acima. De acordo com instruções internas da Nestlé, o número mínimo de amostras necessário para fazer uma calibração situa-se entre as 25 e as 30, pelo que se teve este facto em consideração, não procedendo ao desenvolvimento de modelos matemáticos com menos de 25 amostras. Em alguns casos, nomeadamente nas pré-misturas láctea simples e não-lácteas multifrutos e simples para o ferro e nas pré-misturas lácteas com banana e frutos para o cálcio, não foi possível observar a presença de todas as condições acima referidas, não havendo, desta forma, as evidências científicas suficientes para o desenvolvimento de um modelo de regressão linear adequado.

Relativamente à pré-mistura utilizada na farinha láctea Simples, foram desenvolvidos modelos matemáticos que relacionam as concentrações de ambos os métodos de análise, para cálcio e vitamina C. Mediante os resultados pode-se concluir que há evidências estatisticamente significativas para afirmar que as condições de aplicabilidade da regressão estão garantidas, sendo o modelo proposto o mais adequado aos dados em questão. Contudo, não se obtiveram as mesmas conclusões na análise do ferro. Neste caso, apesar de os resíduos seguirem uma distribuição normal e a sua variância ser constante, a condição de independência não foi garantida o que impossibilitou a aplicação do modelo, com um nível de confiança de 95%.

A tabela 11 resume os valores dos parâmetros da equação bem como os valores de prova associados a cada um, para um intervalo de confiança de 95%, sendo β_1 a ordenada na origem, β_2 o declive da reta, R^2 o coeficiente de correlação e N o número de amostras utilizadas na curva de calibração. Nos casos em que o valor dos coeficientes β_1 e β_2 dos modelos não apresentou significância estatística (sig. > 0,05) este coeficiente não foi utilizado no modelo preditivo, o que nas tabelas está identificado como não aplicável (n.a.).

Tabela 11 – Modelos de regressão linear entre métodos de análise de referência e métodos de análise alternativos para medição de cálcio e vitamina C na pré-mistura utilizada em Farinha Láctea Simples.

Elemento	β_1		β_2		Modelo matemático	R^2	N
Cálcio	n.a.	n.a.	0,908	Sig.<0,001	$\bar{Y} = 0,908 \times \bar{X}$	0,904	28
Vitamina C	n.a.	n.a.	0,961	Sig.<0,001	$\bar{Y} = 0,961 \times \bar{X}$	0,956	26

Para a pré-mistura utilizada na farinha láctea com Pera, foi possível desenvolver os três modelos. Contudo, como se pode observar, para o ferro houve necessidade de excluir mais amostras, uma vez que em algumas gamas de concentração as diferenças foram relativamente grandes. Contudo, como esta diferença não foi observada em todas as amostras da mesma concentração pode-se inferir que tenha havido um problema na preparação da respetiva pré-mistura ou mesmo na sua análise pelo método alternativo. Conforme anteriormente, pode-se concluir que há evidências estatisticamente significativas para afirmar que as condições de aplicabilidade da regressão estão garantidas nos três casos. Os modelos propostos, cujos parâmetros estão evidenciados na tabela 12, são os mais adequados aos dados em questão.

Tabela 12 – Modelos de regressão linear entre métodos de análise de referência e métodos de análise alternativos para medição de cálcio, ferro e vitamina C na pré-mistura utilizada em Farinha Láctea com Pera.

Elemento	β_1		β_2		Modelo matemático	R^2	N
Cálcio	2,341	Sig.<0,05	0,881	Sig.<0,001	$\bar{Y} = 2,341 + 0,881 \times \bar{X}$	0,916	32
Ferro	n.a.	n.a.	0,959	Sig.<0,001	$\bar{Y} = 0,959 \times \bar{X}$	0,826	27
Vitamina C	n.a.	n.a.	0,910	Sig.<0,001	$\bar{Y} = 0,910 \times \bar{X}$	0,911	33

Na pré-mistura constituinte da farinha láctea com Maçã, foi também possível desenvolver modelos capazes de predizerem a concentração de cálcio, ferro e vitamina C, cujos parâmetros estão evidenciados na tabela 13. Assim, é possível concluir-se que há evidências estatisticamente significativas para afirmar que as condições de aplicabilidade da regressão estão garantidas nos três casos, sendo os modelos propostos os mais adequados aos dados em questão.

Tabela 13 – Modelos de regressão linear entre métodos de análise de referência e métodos de análise alternativos para medição de cálcio, ferro e vitamina C na pré-mistura utilizada em Farinha Láctea com Maçã.

Elemento	β_1		β_2		Modelo matemático	R^2	N
Cálcio	n.a.	n.a.	0,934	Sig.<0,001	$\bar{Y} = 0,934 \times \bar{X}$	0,952	34
Ferro	0,229	Sig.<0,01	0,877	Sig.<0,001	$\bar{Y} = 0,229 + 0,877 \times \bar{X}$	0,959	28
Vitamina C	n.a.	n.a.	0,903	Sig.<0,001	$\bar{Y} = 0,903 \times \bar{X}$	0,903	32

Para a pré-mistura usada na formulação da farinha láctea com Tâmaras, os resultados foram bastante positivos. Como se pode constatar com a informação apresentada na tabela 14, ambos os coeficientes β_1 e β_2 foram estatisticamente significativos, para o intervalo de confiança de 95%. Nos três casos, conseguiram obter-se coeficientes de correlação elevados, não tendo sido necessário

excluir praticamente amostras. À semelhança dos casos anteriores, há evidências estatisticamente significativas que permitem a aplicabilidade da regressão linear e o desenvolvimento de modelos preditivos das concentrações de cálcio, ferro e vitamina C, cujos parâmetros estão resumidos na tabela 14.

Tabela 14 – Modelos de regressão linear entre métodos de análise de referência e métodos de análise alternativos para medição de cálcio, ferro e vitamina C na pré-mistura utilizada em Farinha Láctea com Tâmaras.

Elemento	β_1		β_2		Modelo matemático	R^2	N
Cálcio	2,807	Sig.<0,05	0,896	Sig.<0,001	$\bar{Y} = 2,807 + 0,896 \times \bar{X}$	0,909	32
Ferro	0,318	Sig.<0,05	0,858	Sig.<0,001	$\bar{Y} = 0,318 + 0,858 \times \bar{X}$	0,918	28
Vitamina C	1,544	Sig.<0,01	0,860	Sig.<0,001	$\bar{Y} = 1,544 + 0,860 \times \bar{X}$	0,924	33

De uma maneira geral, para as pré-misturas pertencentes ao grupo 1a, pode-se concluir que se obtiveram melhores resultados para cálcio e vitamina C, em detrimento do ferro, o que é confirmado pelo maior erro relativo como evidenciado na tabela 10. Contudo, quase na totalidade das pré-misturas foi possível definir modelos matemáticos de regressão linear para os três elementos estudados neste trabalho.

De seguida são apresentados os resultados obtidos para a pré-mistura usada na elaboração da farinha láctea Multifrutos. O coeficiente de correlação entre os métodos de análise foi baixo apenas para o cálcio, o que é justificado pelo maior erro relativo, como mostra a tabela 10. Neste caso não se excluíram mais amostras uma vez que os erros relativos maiores observaram-se em todas as amostras com uma concentração específica. Por exemplo, as quatro amostras experimentais elaboradas com concentrações de referência entre os 6,20 g/100g e 8,60 g/100g apresentaram erros relativos percentuais na ordem dos 20% e 13%, respetivamente. Estes resultados podem justificar-se por várias razões entre as quais uma eventual menor sensibilidade nesta gama de concentração ou uma possível interacção do cálcio com outros constituintes. Na análise dos resultados de ferro e vitamina C pode-se concluir que estes foram mais satisfatórios. Contudo, em todos os casos, os parâmetros dos modelos apresentados são estatisticamente significativos, estando as condições de aplicabilidade da regressão garantidas nos três casos. Estes resultados são apresentados na tabela 15.

Tabela 15 – Modelos de regressão linear entre métodos de análise de referência e métodos de análise alternativos para medição de cálcio, ferro e vitamina C na pré-mistura utilizada em Farinha Láctea Multifrutos.

Elemento	β_1		β_2		Modelo matemático	R^2	N
Cálcio	2,806	Sig.<0,05	0,729	Sig.<0,001	$\bar{Y} = 2,806 + 0,729 \times \bar{X}$	0,732	30
Ferro	n.a.	n.a.	0,924	Sig.<0,001	$\bar{Y} = 0,924 \times \bar{X}$	0,909	35
Vitamina C	n.a.	n.a.	0,904	Sig.<0,001	$\bar{Y} = 0,904 \times \bar{X}$	0,912	31

Pelos resultados obtidos para a pré-mistura constituinte da farinha láctea com Banana, não foi possível desenvolver um modelo matemático preditivo da relação existente entre as concentrações de referência e alternativas para o cálcio, uma vez que não houve evidências estatisticamente significativas que permitissem afirmar que as condições de aplicabilidade da regressão linear eram garantidas. Mais concretamente, não se verificou a independência dos resíduos. Como se constata na tabela 10 o erro relativo rondou os 6%. Como no caso anterior, as concentrações em que se obtiveram piores resultados rondaram os 6,20 g/100g e os 8,60 g/100g. Observaram-se erros relativos na ordem dos 20% a 26% na gama de concentrações de 8,4 g/100g a 8,90 g/100g, respetivamente. Estes resultados vêm corroborar a hipótese proposta anteriormente, de que talvez haja uma menor sensibilidade nesta gama de concentração ou uma possível interação do cálcio com outros constituintes. No que diz respeito aos resultados obtidos para ferro e vitamina C, pode-se verificar que em ambos os casos os coeficientes de correlação foram elevados. Nestes casos há, portanto, significância estatística para afirmar que a aplicação destes modelos é possível, dada a garantia da existência das condições de aplicabilidade da regressão linear. Na tabela 16, são resumidos os resultados relativos a esta pré-mistura.

Tabela 16 – Modelos de regressão linear entre métodos de análise de referência e métodos de análise alternativos para medição de ferro e vitamina C na pré-mistura utilizada em Farinha Láctea com Banana.

Elemento	β_1		β_2		Modelo matemático	R^2	N
Ferro	n.a.	n.a.	0,917	Sig.<0,001	$\bar{Y} = 0,917 \times \bar{X}$	0,921	33
Vitamina C	n.a.	n.a.	0,959	Sig.<0,001	$\bar{Y} = 0,959 \times \bar{X}$	0,946	31

Os resultados obtidos para a pré-mistura utilizada na farinha láctea com Frutos foram muito semelhantes aos obtidos para a pré-mistura anterior. No caso do estudo do cálcio, verifica-se que da mesma forma que anteriormente, os piores resultados foram observados na mesma gama de concentrações atrás referida, tendo sido observados erros relativos na ordem dos 25%. Quanto aos resultados relativos ao estudo do ferro e da vitamina C pode-se constatar, pela tabela 17, que os

resultados foram muito positivos. Assim, para os modelos de regressão linear desenvolvidos é possível afirmar que existe significância estatística para a sua aplicação, dado que as condições da sua aplicabilidade estão garantidas.

Tabela 17 – Modelos de regressão linear entre métodos de análise de referência e métodos de análise alternativos para medição de ferro e vitamina C na pré-mistura utilizada em Farinha Láctea com Frutos.

Elemento	β_1		β_2		Modelo matemático	R^2	N
Ferro	n.a.	n.a.	0,981	Sig.<0,001	$\bar{Y} = 0,981 \times \bar{X}$	0,983	34
Vitamina C	n.a.	n.a.	0,944	Sig.<0,001	$\bar{Y} = 0,944 \times \bar{X}$	0,947	31

Ao contrário do grupo 1a, este grupo de pré-misturas obteve piores resultados para o elemento cálcio. Por um lado, este resultado pode advir do facto de as concentrações trabalhadas se situarem numa gama de concentração em que o aparelho tenha pouca sensibilidade. O limite de deteção deste tipo de espectrofotómetros para cálcio e ferro é, geralmente, muito mais baixo do que as concentrações analisadas (na ordem das partes por milhão) pelo que a proximidade a este valor não parece ser uma justificação para os resultados (Kellner *et al.*, 1998; Pashkova, 2009). Por outro lado, estes resultados podem estar relacionados com uma possível interação entre o cálcio e o ferro. Pelos resultados acima descritos, parece viável inferir-se que o carbonato de cálcio interage de uma forma mais negativa com o pirofosfato de ferro do que com o fumarato de ferro. Segundo Mehansho e Smith (1994) a formulação de misturas de suplementos de cálcio e suplementos de ferro é especialmente difícil uma vez que estes minerais tendem a interagir. A maioria da bibliografia existente nesta área estuda o efeito do carbonato de cálcio na absorção do ferro, por parte do organismo, não havendo propriamente conclusões acerca da interação química nas misturas em pó. Segundo a evidência científica elevados níveis de cálcio diminuem a absorção do ferro por parte do organismo (Allen e Benoist, 2006; Mehansho e Smith, 1994). O mecanismo desencadeante desta absorção diminuída é desconhecido, contudo pode estar relacionado com a complexação ou precipitação do ferro (Medical Professionals, 2009). No fumarato ferroso o ferro está na sua forma divalente enquanto que no pirofosfato de ferro está na sua forma trivalente. A diferença da interação entre os compostos pode também advir deste facto.

Relativamente à pré-mistura constituinte da farinha não láctea Multifrutos, desenvolveram-se modelos para o cálcio e para a vitamina C, cujos parâmetros se encontram apresentados na tabela 18. Como se pode verificar, os coeficientes de correlação para ambos é muito elevado, o que espelha a capacidade do método de análise alternativo em prever as concentrações obtidas pelo método de análise de referência. Nestes dois casos, foram garantidas as condições de aplicabilidade da regressão linear. Pelo contrário, para o elemento ferro, a aplicabilidade destas condições não foi possível uma vez que a independência dos resíduos não foi satisfeita. Como se pode observar pela tabela 10, o erro relativo foi bastante alto. Assim, não há evidências estatisticamente significativas

suficientes para a aplicação de um modelo matemático. Na gama de concentrações de aproximadamente 1,5 g/100g, correspondente às concentrações trabalhadas na linha de produção, o erro relativo médio entre os valores obtidos e os valores de referência é de -7,2%. Nas amostras experimentais, as diferenças verificadas foram todas positivas, ou seja nestes casos a concentração das amostras está a ser sobrestimada, em média em 0,18 g/100g \pm 0,099 g/100g, sendo o erro relativo neste caso de aproximadamente 17%. Os piores resultados obtidos foram observados nas concentrações abaixo de 1g/100g, em que o erro relativo foi de 5,72%. Nas restantes pré-misturas com concentrações de ferro similares, nomeadamente a pré-mistura constituinte da farinha láctea com Banana, do grupo 1b, os resultados foram bastante melhores, uma vez que as diferenças observadas, para a gama de concentrações aproximadamente de 1,5g/100g, são muito menores sendo a média das diferenças observadas de 0,056 g/100g \pm 0,036 g/100g, correspondendo a um erro relativo de -3,9%.

Tabela 18 – Modelos de regressão linear entre métodos de análise de referência e métodos de análise alternativos para medição de cálcio, e vitamina C na pré-mistura utilizada em Farinha Não Láctea Multifrutos.

Elemento	β_1		β_2		Modelo matemático	R^2	N
Cálcio	n.a.	n.a.	0,961	Sig.<0,001	$\bar{Y} = 0,961 \times \bar{X}$	0,961	32
Vitamina C	n.a.	n.a.	0,956	Sig.<0,001	$\bar{Y} = 0,956 \times \bar{X}$	0,956	33

Por último, são apresentados na tabela 19 os resultados relativos à pré-mistura não láctea Simples. Conforme se pode observar, para a análise do ferro não foi possível desenvolver um modelo matemático, o que decorreu da ausência de independência dos resíduos, que impossibilitou a aplicabilidade da regressão linear. Neste caso, os erros relativos observados foram bastante elevados, como evidenciado na tabela 10. Em média, as diferenças positivas resultaram num erro relativo percentual aproximadamente de 7% e as diferenças negativas na ordem dos 5%. Para o cálcio e a vitamina C foi possível obter bons resultados. Assim, dado que as condições de aplicabilidade da regressão linear foram confirmadas para estes dois elementos, foram definidos os modelos matemáticos, cujos parâmetros são apresentados na tabela 19. As duas últimas pré-misturas foram as últimas a serem preparadas e analisadas em ambos os aparelhos pelo que não foi possível, por questões de tempo, proceder às repetições analíticas necessárias. Nos produtos anteriores, conseguiu-se repetir algumas análises inicialmente discrepantes, quer pelo método de análise de referência quer pelo método de análise alternativo, de forma a verificar se houve algum erro de medição da primeira vez que foram analisadas.

Tabela 19 – Modelos de regressão linear entre métodos de análise de referência e métodos de análise alternativos para medição de cálcio e vitamina C na pré-mistura utilizada em Farinha Não Láctea Simples.

Elemento	β_1		β_2		Modelo matemático	R^2	N
Cálcio	3,853	Sig.<0,05	0,860	Sig.<0,001	$\bar{Y} = 3,853 + 0,860 \times \bar{X}$	0,885	31
Vitamina C	n.a.	n.a.	0,984	Sig.<0,001	$\bar{Y} = 0,984 \times \bar{X}$	0,940	32

De um modo geral, como se pode observar os resultados relativos à vitamina C foram bastante satisfatórios para a totalidade das pré-misturas, sendo o erro relativo sempre menor que 0,05 (5%). A correlação mais fraca verificou-se na pré-mistura com aroma de maçã. O coeficiente de correlação observado é, em mais de 75% dos casos, acima de 0,90, valor muito próximo da unidade. Com isto, percebe-se que a correlação entre os métodos de análise para a vitamina C é bastante boa, ou seja a previsão dos resultados dados pelo método de análise alternativo aproxima-se muito dos resultados medidos pelo método analítico de referência.

A comparação dos resultados deste estudo com estudos similares é difícil, uma vez que os estudos existentes com objetivos idênticos apenas são realizados em produtos terminados e não em produtos como as pré-misturas (Almeida, 2009; Costa, 2011; Perring e Andrey, 2003; Kruus, 2010). Para além das matrizes serem diferentes, as unidades trabalhadas em cada um dos casos é, também, diferente. Nos produtos terminados as concentrações são da ordem dos mg/100g enquanto que nas pré-misturas as unidades são de g/100g. Contudo, no estudo de Costa (2011) os modelos de calibração criados mostraram um bom comportamento na análise de cálcio e ferro de todos os produtos de produção. No trabalho desenvolvido por Almeida (2009), as correlações obtidas no estudo da vitamina C não apresentaram uma linearidade forte, estando os dados muito dispersos.

Como referido no capítulo 3, após a análise pelo SPSS, excluíram-se, dos programas dos aparelhos de análise alternativa (*MINIPAL & MINIMATE* no aparelho de XRF e *OPUS/QUANT* no aparelho de NIR), as amostras que não se incluíram nos modelos de calibração desenvolvidos, de forma a garantir que os modelos finais traduziam a confiabilidade necessária em termos estatísticos. Foi possível verificar-se que houve, na generalidade, uma melhoria do coeficiente de correlação inicial proposto.

De forma a melhorar os modelos criados e a criar as condições necessárias para a aplicação da regressão linear, nos casos em que não foram verificadas, deve-se proceder ao aumento do número de amostras a incluir nos modelos de calibração, particularmente das amostras elaboradas em laboratório. Nas curvas atuais o peso relativo da parte central é muito grande, e faz com que as extremidades da curva não tenham tanta influência no modelo, forçando o seu desenho matemático a considerar maioritariamente os valores centrais.

5. Conclusões Gerais

A partir dos resultados de calibração obtidos é possível concluir que a espectroscopia de XRF e que a espectroscopia de NIR são métodos capazes de quantificar, demonstrando uma correlação elevada com os métodos analíticos de referência, os teores de cálcio e ferro e vitamina C, respetivamente, em pré-misturas constituintes de farinhas lácteas e não lácteas.

De acordo com a divisão de pré-misturas efetuada concluiu-se que o grupo 1a obteve resultados muito satisfatórios no estudo do cálcio e da vitamina C. Na análise do ferro os resultados foram menos positivos, não tendo sido possível o desenvolvimento de um modelo de calibração para a pré-mistura utilizada na farinha láctea Simples, dada a inexistência de evidências estatisticamente significativas suficientes para assegurar as condições de aplicabilidade da regressão linear. Pela mesma razão, nas pré-misturas do grupo 1b, no estudo do cálcio não se desenvolveram os modelos matemáticos para as pré-misturas constituintes das farinhas lácteas com Banana e Frutos. Neste grupo, o ferro e a vitamina C foram os elementos com melhores resultados. A ausência da totalidade das condições de aplicabilidade da regressão linear não permitiu o desenvolvimento de modelos matemáticos, para ferro nas pré-misturas dos grupos 2 e 3. Os resultados para cálcio e vitamina C foram muito positivos, observando-se uma elevada correlação entre os métodos de análise.

De maneira a concluir se de facto estes métodos de análise podem ser considerados alternativos à Espectrofotometria de Absorção Atómica e à Titulação Potenciométrica, deve efetuar-se a validação dos modelos atuais. Só assim, se poderá garantir que estes modelos criados são passíveis de substituir os métodos analíticos de referência. Este trabalho futuro desenha-se como indispensável uma vez que esta análise alternativa é, sem dúvida, mais rápida, possibilitando a sua realização continuamente na linha de produção, e exige menos recursos materiais, facilitando a preparação e a manipulação das amostras. Para além desta validação, posteriormente, deverá proceder-se à monitorização de forma a verificar e controlar a eficácia dos modelos validados.

6. Bibliografia

Allen, L., Benoist, B. (2006). Guidelines on food fortification with micronutrients. Retrieved April 10, 2014 from <http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/9241594012/en/>

Almeida, F. (2009). Espectroscopia de Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier (FT-NIR) na Caracterização de Farinhas para Alimentação Pueril. Dissertação para obtenção do grau mestre em Engenharia Biológica. Universidade Técnica de Lisboa.

American Academy of Pediatrics. (1999). Iron Fortification of Infant Formulas. *Pediatrics Oficial Jornal of the American Academy of Pediatrics*. Retrieved April 16, 2014 from <http://pediatrics.aappublications.org/content/104/1/119.full.html>

Anonymous. (1999). Sodium, Potassium, Calcium, Manesium, Iron an Zinc - Atomic Absorption Spectrophotometry. Laboratory Instrutions. p. 17. Nestlé, Switzerland.

Anonymous. (2005). Minipal 4 X-Ray Spectrometer User's Guide 1st ed., pp. C-14. PANalytical B.V. Neherlands.

Anonymous (2006). OPUS Spectroscopy Software User Manual QUANT. Version 6. BRUKER OPTIK GmbH. Ettlingen, Germany. Retrieved April 18, 2014, from <http://files.nocnt.ru/hardware/science/senterra/opus65-doc-en/quant.pdf>

Anonymous. (2009). Ascorbic Acid by Visual Titration. Laboratory Instrutions. p. 11. Nestlé, Switzerland.

Anónimo. (2011). Princípios Corporativos Empresariais da Nestlé. Nestlé, Switzerland. Retirado a 18 de Março de 2014 de <http://www.empresa.nestle.pt/conhecaanestle/principioscorporativos>.

Anonymous. (2011). *WORLD LEADER IN AA , ICP-OES AND ICP-MS*. Perkin Elmer. Waltham, Massachusetts. Retrieved March 01, 2014 from http://www.perkinelmer.com/Content/relatedmaterials/brochures/bro_worldleaderaaicpmsicpms.pdf

Anonymous (2013). MPA Multi Purpose Analyzer. BRUKER OPTIK GmbH. Ettlingen, Germany. Retrieved April 18, 2014, from http://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/OpticalSpectroscopy/FT-NIR/MPA/Brochures/MPA_Brochure_EN.pdf

Avitech Animal Health Pvt. Ltd. (2007). Chemical composition of feed premixes Manufacturing a Quality Premix. Animal Feed. Retrieved April 16, 2014, from <http://en.engormix.com/MA-feed-machinery/manufacturing/articles/manufacturing-quality-premix-t669/801-p0.htm>

Bakeev, K. A. (2005). Process Analytical Technology. Blackwell Publishing.

Bergles, E., Yang, W. (2009). Profiting from telecom investments: Taking advantage of the NIR First Overtone and Raman's Spectral Fingerprints *Photonics Spectra*. Retrieved March 18, 2014, from <http://www.photonics.com/Article.aspx?AID=38689>

Brouwer, P. (2013). Theory of XRF Getting acquainted with the principles. PANalytical B.V.

Buchini, L. (2010). Report on a methodology to identify adequate food vehicles , based on most likely public health benefit and economic viability **32**:1–30).

Buckman-Ellis, J. (2004). X-Ray Fluorescence Theory. Retrieved April 09, 2014, from <http://mxp.physics.umn.edu/s04/Projects/s04xrf/theory.htm>

Cabral, R., Sarsfield, J. A. (1997). Estatística. 1st ed. pp 40–41. McGraw-Hill Portugal.

Coelho, M. (n.d.). *Tecnologia de Pós*. Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa.

Costa, H. (2011). Análise de Produtos de Nutrição Infantil por Fluorescência de Rx. Universidade de Aveiro.

Davidsson, L., Al, E. (2009). Regular consumption of a complementary food fortified with ascorbic acid and ferrous fumarate or ferric pyrophosphate is as useful as ferrous sulfate in maintaining hemoglobin concentrations >105 g/L in young Bangladeshi children. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **89** (6):1815–20. doi:10.3945/ajcn.2008.27353

Decreto-Lei n.º 53/2008 de 25 de Março. *Diário da República n.º 59*. 1.ª Série. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Retirado a 10 de Abril de 2014 de <http://dre.pt/pdf1sdip/2008/03/05900/0166701674.PDF>

DRSP. (2006). Comer com saber...no primeiro ano de vida. p. 52. Região Autónoma da Madeira. Retirado a 10 de Abril de 2014 de http://www.alimentacaosaudavel.dgs.pt/media/1498/comer-com-saber_mo-primeiro-ano-de-vida.pdf

FAO/WHO. (1998). Vitamin and mineral requirements in human nutrition 2nd ed. (p. 340). Bangkok, Thailand.

Ferreira, M. M. C., Al, E. (1999). Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. *Química Nova*, **22**(5):724–731. doi:10.1590/S0100-40421999000500016

Fortitech Premixes. (2013). Blending and processing nutrient premixes | Fortitech Premixes. *Fortitech Premixes Strategy Nutrition Blog*. Retrieved April 18, 2014, from <http://www.fortitechpremixes.com/formulation/blending-and-processing-nutrient-premixes/>

GÁL, I. (1936). Estimation of Ascorbic Acid (Vitamin C) by Titration. *Nature* **138**. doi:10.1038/138799a0

Griffiths, P. R., Haseth, J. A. de. (2007). Fourier Transform Infrared Spectrometry. 2nd ed.. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. Hoboken.

Guerra, A. *et al.* (2012). Alimentação e Nutrição do Lactente. *Acta Médica Portuguesa*, **43(5)**:S17–S40. Retirado a 10 de Abril de http://www.spp.pt/Userfiles/File/App/Artigos/34/20121029190143_SupIII_Acta_Pediat_Vol43_N5.pdf

Herron, M. M., Herron, S., Charsky, A., Akkurt, R. (2013). Diffuse reflectance infrared fourier transform spectroscopy for characterization of earth materials. United States. Retrieved April 9, 2014, from <http://www.google.com/patents/US20130046469>

Hurrell, R. F. (2002). Fortification: Overcoming Technical and Practical Barriers. *J. Nutr.*, **132(4)**:806S–812. Retrieved April 18, 2014, from <http://jn.nutrition.org/content/132/4/806S.full>

Institute of Medicine, Food and Nutrition Board (2006). Dietary Reference Intakes Essential Guide Nutrient Requirements. Washington DC: Retrieved February 18, 2014 from <http://www.iom.edu/reports/2006/dietary-reference-intakes-essential-guide-nutrient-requirements.aspx>

ISO. (2005). Sistemas de gestão da qualidade Fundamentos e vocabolário_ *ISO 9000:2005*. pp. 1–41.

Kellner, R., & et al. (1998). *Analytical Chemistry* (1st ed., pp. 465–481). Wiley-VCH.

Kruus, L. (2010). Determination of Calcium , Potassium , Phosphorus and Magnesium in Forages by Energy Dispersive X-ray Fluorescence Spectrometry Master's thesis. University of Tartu Faculty of Science and Technology.

Mahan, L. K., Escott-Stump, S. (2008). Krause's Food & Nutrition Therapy 12th ed. p. 1352. Canada: Saunders Elsevier.

Medical Professionals. (2009). Drug Interactions. Retrieved May 10, 2014 from <http://doublecheckmd.com/EMDDrugForm.do?reviewId=2962&mode=forReview>

Mehansho, H., Smith, K. (1994) Iron-calcium mineral supplements with enhanced bioavailability. Retrieved April 20, 2014 from <http://www.google.com/patents/EP0297681B1?cl=en>

Metcalfe, E. (1987). Atomic Absorption and Emission Spectroscopy. 1st ed. p. 120. John Wiley & Sons, ACOL.

Nave, R. (2000). Characteristic X-rays. *HyperPhysics*. Retrieved May 18, 2014, from <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/quantum/xrayc.html>

NIH. (n.d.). Vitamin C Fact Sheet for Health Professionals. Retrieved February 01, 2014, from <http://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminC-HealthProfessional/>

Olivares, M. *et al.* (1999). Anaemia and iron deficiency disease in children. *British Medical Bulletin*, **55**(3):534–43. Retrieved February 01, 2014 from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10746344>

Pashkova, G. V. (2009). X-ray Fluorescence Determination of Element Contents in Milk and Dairy Products. *Food Analytical Methods*, **2**(4):303–310. doi:10.1007/s12161-009-9080-5

Perkins, W. D. (1986). Fourier Transform-Infrared Spectroscopy Part I. Instrumentation. *Journal of Hemical Education*, **63**(1):A5–A10. Retrieved March 20, 2014 from <http://www-sul.stanford.edu/depts/swain/services/courses/chem174/JCE1986p.pdf>

Perring, L.; Andrey, D. (2003). ED-XRF as a tool for rapid minerals control in milk-based products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**(15):4207–12. doi:10.1021/jf034158p

Perring, L., *et al.* (2005). Rapid quantification of iron, copper and zinc in food premixes using energy dispersive X-ray fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*, **18**(7):655–663. doi:10.1016/j.jfca.2004.06.011

Pimentel, M. F., *et al.* (2008). Recomendações para calibração em Química Analítica parte 2: calibração multianálito. *Química Nova*, **31**(2):462–467. doi:10.1590/S0100-40422008000200047

Regulamento (UE) N.º 609/2013. *Jornal Oficial Da União Europeia*. Retirado a 18 de Fevereiro de 2014 de <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:181:0035:0056:PT:PDF>

Seibert, J. A. (2004). X-ray imaging physics for nuclear medicine technologists. Part 1: Basic principles of x-ray production. *Journal of Nuclear Medicine Technology*, **32**(3):139–47. Retrieved April 25, 2014 from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15347692>

Skoog, D., & *et al.* (2004). Fundamentals of Analytical Chemistry 8th ed. International Student Edition.

Telko, M. J., Hickey, A. J. (2005). Dry Powder Inhaler Formulation, 1209–1227.

Thermo Scientific. (n.d.). EDXRF Analysis of Filter Debris. *ThermoFisher Scientific*. Retrieved April 20, 2014, from <http://www.thermo.com.cn/Article.aspx?ID=1238>

WHO. (n.d.). WHO | Breastfeeding. Retrieved March 10, 2014 from <http://www.who.int/topics/breastfeeding/en/>

Wirth, K. (n.d.). X-Ray Fluorescence (XRF). Retrieved May 10, 2014, from http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/XRF.html

7. Apêndices

Apêndice I – Resultados gráficos das curvas de calibração de Cálcio, Ferro e Vitamina C para todos os produtos analisados.

PRÉ-MISTURA CONSTITUINTE DA FARINHA LÁCTEA SIMPLES

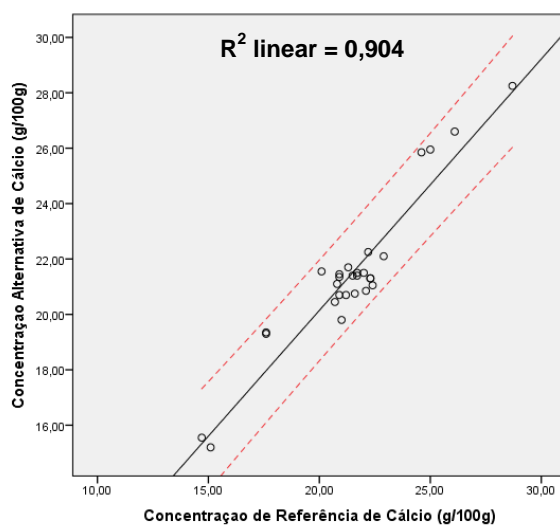


Figura 29 – Curva de Calibração de cálcio, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea Simples.

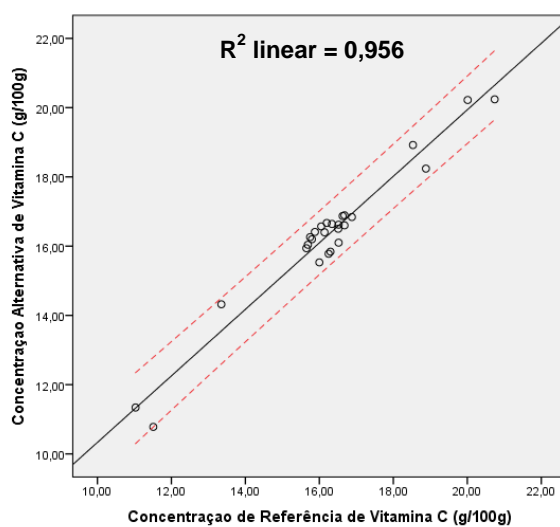


Figura 30 – Curva de Calibração de vitamina C, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea Simples.

PRÉ-MISTURA CONSTITUINTE DA FARINHA LÁCTEA COM PERA

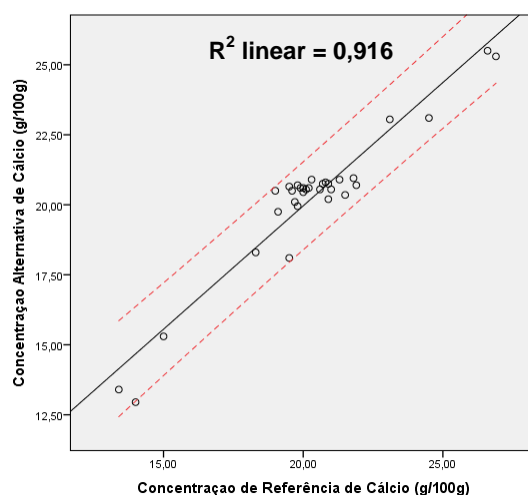


Figura 31 – Curva de Calibração de cálcio, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea com Pera.

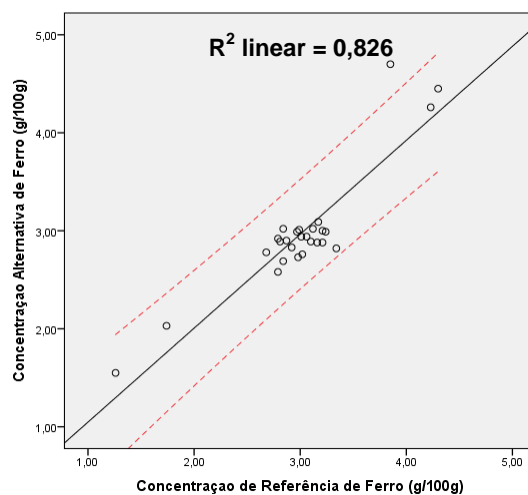


Figura 32 – Curva de Calibração de ferro, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea com Pera.

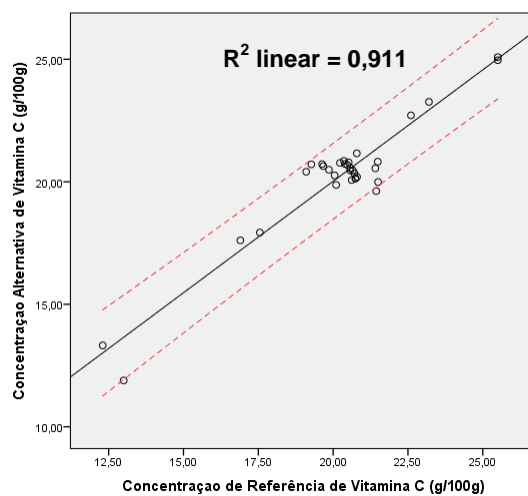


Figura 33 – Curva de Calibração de vitamina C, para Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea com Pera.

PRÉ-MISTURA CONSTITUINTE DA FARINHA LÁCTEA COM MAÇÃ

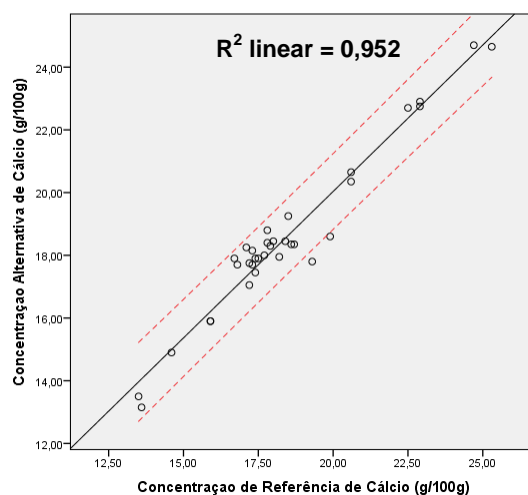


Figura 34 – Curva de Calibração de cálcio, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea com Maçã.

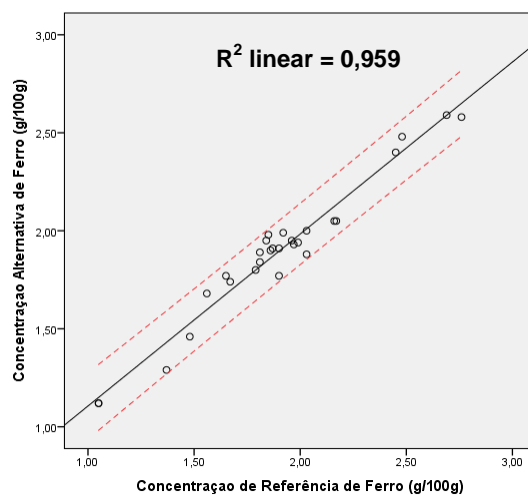


Figura 35 – Curva de Calibração de ferro, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea com Maçã.

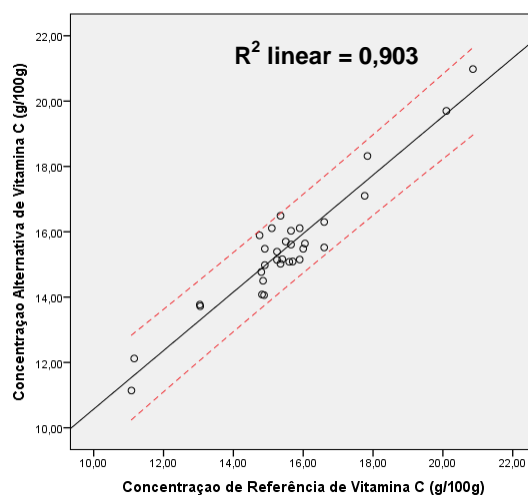


Figura 36 – Curva de Calibração de vitamina C, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea com Maçã.

PRÉ-MISTURA CONSTITUINTE DA FARINHA LÁCTEA COM TÂMARAS

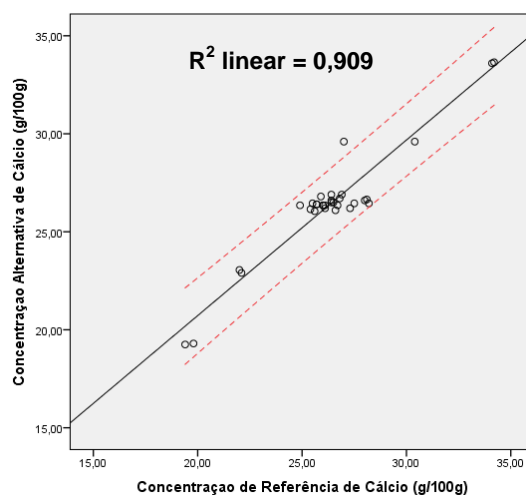


Figura 37 – Curva de Calibração de cálcio, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea com Tâmaras.

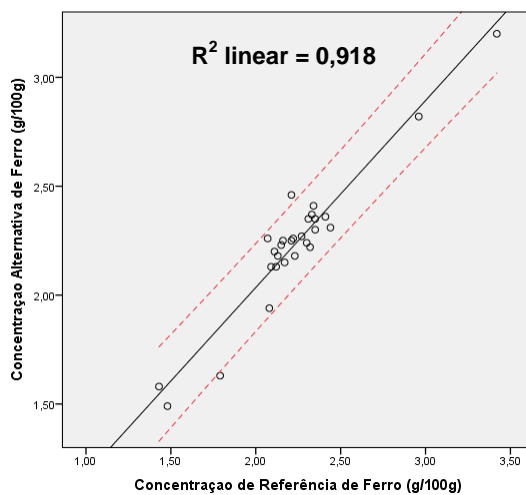


Figura 38 – Curva de Calibração de ferro, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea com Tâmaras.

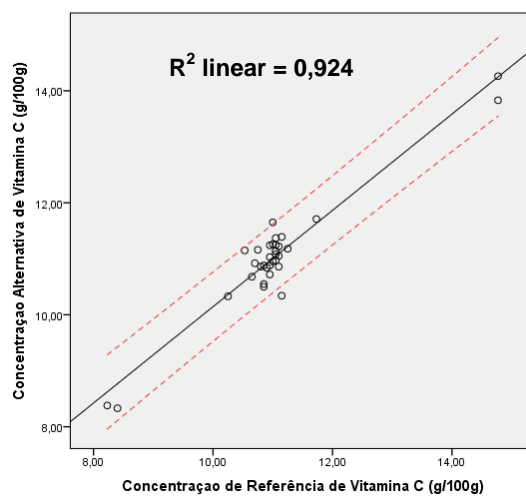


Figura 39 – Curva de Calibração de vitamina C, para Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea com Tâmaras.

PRÉ-MISTURA CONSTITUINTE DA FARINHA LÁCTEA MULTIFRUTOS

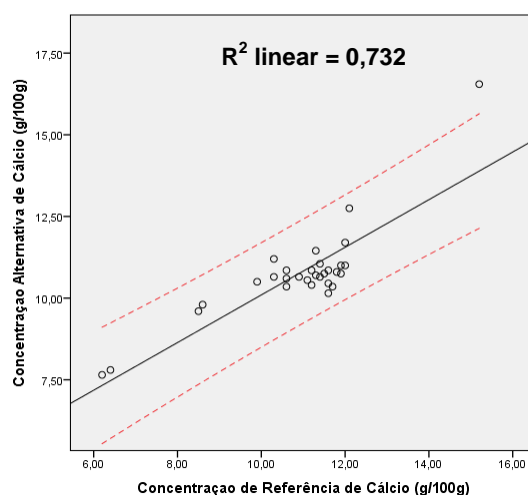


Figura 40 – Curva de Calibração de cálcio, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea Multifrutos.

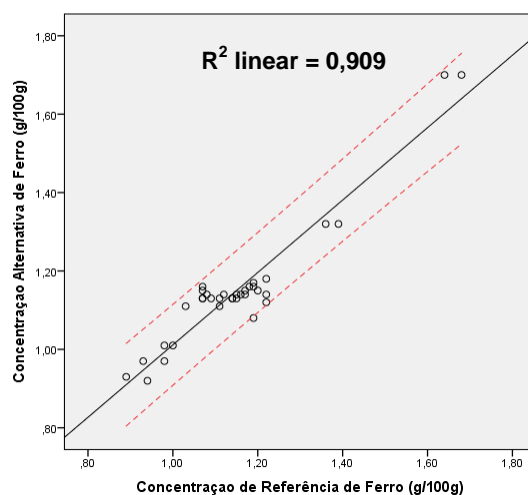


Figura 41 – Curva de Calibração de ferro, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea Multifrutos.

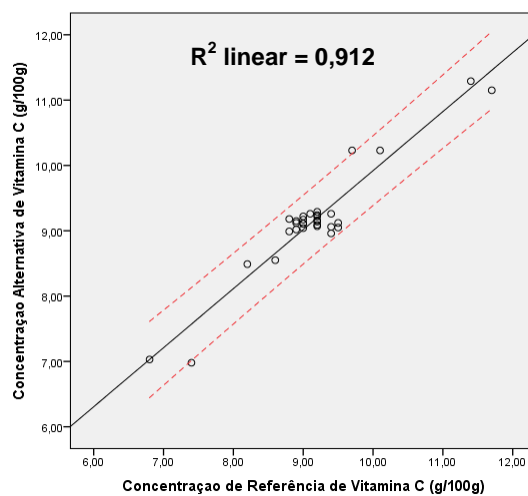


Figura 42 – Curva de Calibração de vitamina C, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea Multifrutos.

PRÉ-MISTURA CONSTITUINTE DA FARINHA LÁCTEA COM BANANA

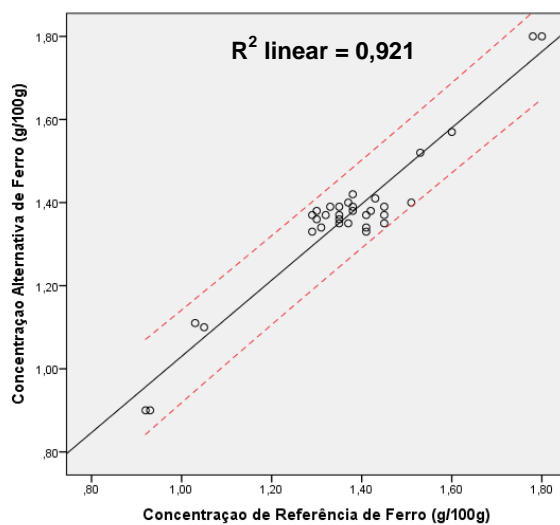


Figura 43 – Curva de Calibração de ferro, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea com Banana.

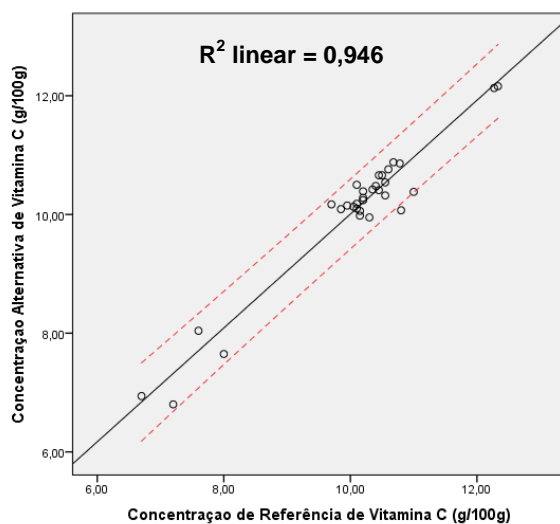


Figura 44 – Curva de Calibração de vitamina C, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea com Banana.

PRÉ-MISTURA CONSTITUINTE DA FARINHA LÁCTEA COM FRUTOS

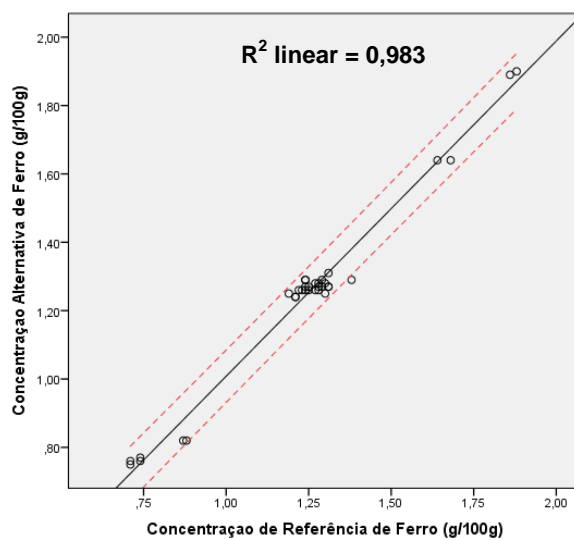


Figura 45 – Curva de Calibração de ferro, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea com Frutos.

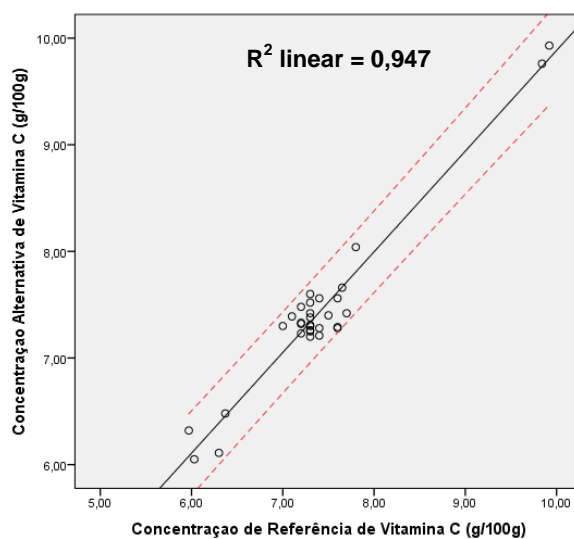


Figura 46 – Curva de Calibração de vitamina C, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Láctea com Frutos.

PRÉ-MISTURA CONSTITUINTE DA FARINHA NÃO LÁCTEA MULTIFRUTOS

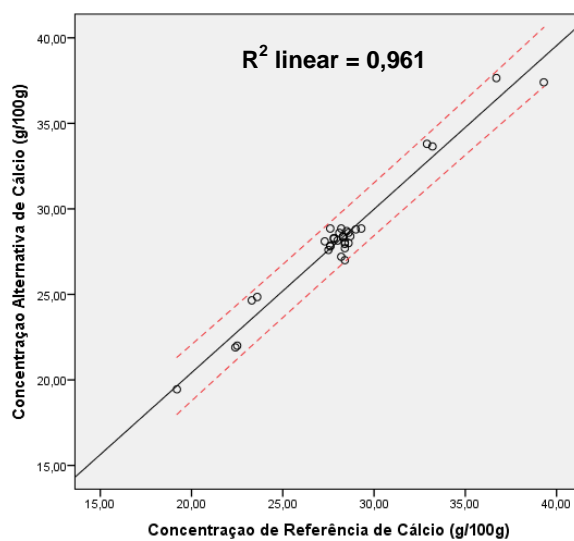


Figura 47 – Curva de Calibração de cálcio, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Não Láctea Multifrutos.

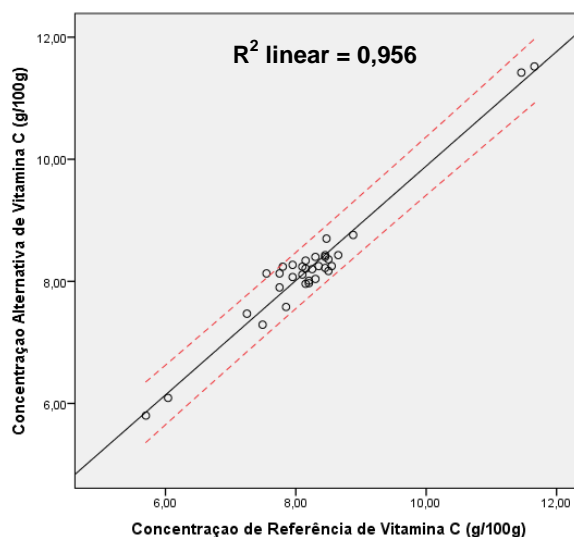


Figura 48 – Curva de Calibração de vitamina C, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Não Láctea Multifrutos.

PRÉ-MISTURA CONSTITUINTE DA FARINHA NÃO LÁCTEA SIMPLES

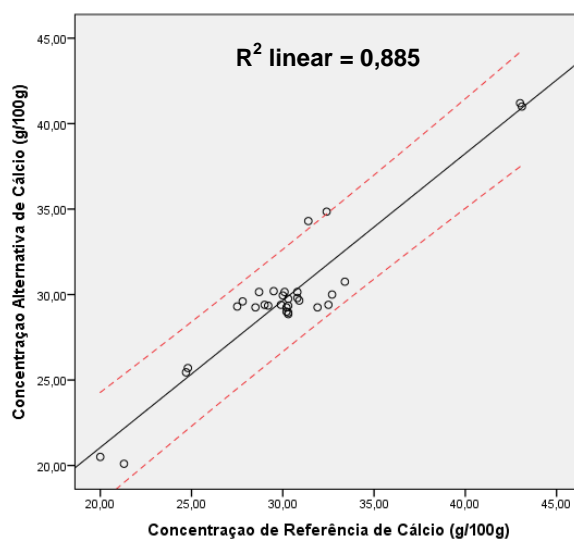


Figura 49 – Curva de Calibração de cálcio, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Não Láctea Simples.

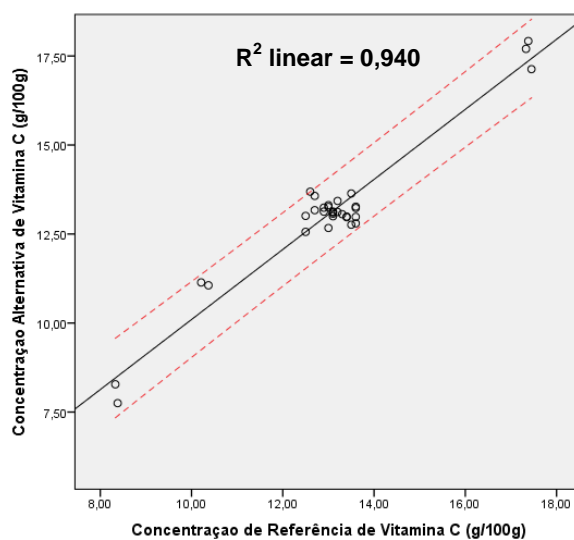


Figura 50 – Curva de Calibração de vitamina C, para a Pré-Mistura constituinte da Farinha Não Láctea Simples.